



⑮ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ **Veröffentlichung**  
⑩ **DE 198 82 943 T 1**

⑤ Int. Cl. 7:  
**C 12 N 5/06**  
A 61 D 19/02  
A 01 K 67/02

der internationalen Anmeldung mit der  
⑥ Veröffentlichungsnummer: WO 99/33956 in  
deutscher Übersetzung (Art. III § 8 Abs. 2 IntPatÜG)  
② Deutsches Aktenzeichen: 198 82 943.4  
⑥ PCT-Aktenzeichen: PCT/US98/27909  
⑥ PCT-Anmeldetag: 31. 12. 1998  
⑦ PCT-Veröffentlichungstag: 8. 7. 1999  
④ Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung  
in deutscher Übersetzung: 1. 2. 2001

③ Unionspriorität:  
09/001,394 31. 12. 1997 US  
09/015,454 29. 01. 1998 US  
⑦ Anmelder:  
XY, Inc., Fort Collins, Col., US; Colorado State  
University Research Foundation, Fort Collins, Col.,  
US  
⑦ Vertreter:  
Kador und Kollegen, 80469 München

⑦ Erfinder:  
Seidel, George E., La Porte, Col., US; Herickhoff,  
Lisa, Fort Collins, Col., US; Schenk, John, Fort  
Collins, Col., US

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤ Geschlechtsspezifische Befruchtung von Säugetieren mit einer geringen Anzahl von Spermazellen

DE 198 82 943 T 1

BEST AVAILABLE COPY

DE 198 82 943 T 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

1 30.08.00

DE 198 82 943 T1

## **Geschlechtsspezifische Befruchtung von Säugetieren mit einer geringen Anzahl von Spermazellen**

### **I. TECHNISCHES GEBIET**

Diese Erfindung bezieht sich im allgemeinen auf das Gebiet der Geschlechtsauswahl des Nachwuchses von Säugetieren. Sie ist speziell relevant für die Aspekte von niedrig dosierter künstlicher Befruchtung und von gesteigerter Produktion von Eiern, um den Nachwuchs mit dem gewünschten Geschlecht zu erzeugen. Besonders betrifft die Erfindung die Erziehung von geschlechtsspezifischer künstlicher Befruchtung mit niedriger Dosierung unbeachtlich der Sortierungstechnik, Systeme für die Sortierung von Sperma mittels Flußzytometrie für geschlechtsspezifische- und Niedrigdosierungsversuche zur künstlichen Befruchtung und Techniken zur Erziehung gesteigerter Ovulationsergebnisse und ähnliches

### **II. HINTERGRUND**

Seit langer Zeit hat es den Wunsch nach der Auswahl des Geschlechts von spezifischem Nachwuchs gegeben. Neben offensichtlichen psychologischen Aspekten hat die tatsächliche Geschlechtsauswahl an Säugetiernachkommen signifikante wirtschaftliche Konsequenzen, wenn man ihre Anwendung auf nahrungsmittelproduzierende Tiere wie Vieh und auch auf gefeierten Trophäentiere wie Pferden usw. bedenkt. Dieser starke Wunsch hat zu einer signifikanten Breite von Versuchen zur Erzeugung von Nachkommen mit vorausgewähltem Geschlecht geführt. Die Versuche, diewahrscheinlich am ehesten als geeignet erschien, um das gewünschte Ergebnis zu erzielen, waren Versuche zur Sortierung und Auswahl zwischen X- und Y-Spermien vor der Befruchtung.

Eine der Herausforderungen, die den Versuch der Sortierung von X- und Y-Spermien betroffen hat, ist die sehr große Anzahl Spermien, die dabei beteiligt sind. Bei der natürlichen Befruchtung werden Spermien in einigen Spezies im Milliardenbereich produziert; bei der künstlichen Befruchtung sind es weniger, aber es wird immer noch eine signifikant sehr hohe Anzahl von Spermien benutzt. Zum Beispiel werden bei künstlichen Befruch-

tungstechniken im allgemeinen 10 Millionen bis 500 Millionen Spermien (in Abhängigkeit von der Art) verwendet. Daher ist eine signifikante Anzahl von Spermien sogar in einer künstlichen Befruchtungsumgebung notwendig.

Viele Methoden sind ausprobiert worden, um die Trennung von X- und Y-chromosomhaltigem Sperma zu erreichen. Diese Methoden reichten von magnetischen Techniken wie in U.S. Patent Nr. 4276139 offenbart, über Säulentechniken wie in U.S. Patent Nr. 5514537 offenbart, zu graphimetrischen Techniken wie in U.S. Patent Nr. 3894529, neu herausgegebenes Patent Nr. 32350, U.S. Patent Nr. 4092229, 4067965, und 4155831 diskutiert. Elektrische Eigenschaften sind ebenfalls ausprobiert worden, wie in U.S. Patent Nr. 4083957 gezeigt ist, sowie eine Kombination von elektrischen und graphimetrischen Eigenschaften, wie in U.S. Patenten Nr. 4225405, 4698142 und 4749458 diskutiert ist. Beweglichkeitsversuche sind auch ausprobiert worden, wie in U.S. Patenten Nr. 4009260 und 4339434 gezeigt ist und auch chemische Techniken wie in U.S. Patenten Nr. 4511661 und 4999283 (unter Einbeziehung von monoklonalen Antikörpern) und U.S. Patent Nr. 5021244, 5346990, 5439362 und 5660997 (unter Einbeziehung von Membranproteinen), und U.S. Patenten 3687803, 4191749, 4448767, und 4680258 (unter Einbeziehung von Antikörpern) ebenfalls wie die Hinzufügung von Serumkomponenten wie in U.S. Patent Nr. 4085205 gezeigt ist. Während jede dieser Techniken als hocheffizient präsentiert wurde, hat tatsächlich bis zum jetzigen Zeitpunkt keine dieser Techniken den gewünschten Level der Geschlechtsvorbestimmung ergeben. Unbeachtlich der Trennungstechnik, die schließlich benutzt wurde, hat es jedoch die konkurrierende Kombination zum einen der hohen Anzahl von Spermien, die natürlicherweise vorhanden sind, und zum anderen der Vorgehensweise der Trennung von X- und Y-chromosomhaltigen Spermien wünschenswert gemacht, die Befähigung zu entwickeln, Befruchtung mit einer geringen Anzahl von Spermien zu erzielen.

Zum jetzigen Zeitpunkt ist die einzige quantitative Technik, die zur Erzielung der Trennung von X- und Y-chromosomhaltigen Spermien verwendet wurde, die, welche die individuelle Unterscheidung und Trennung der Spermien mit Hilfe der Flußzytometrietechnik miteinbezieht. Diese Technik erschien als Ergebnis von Fortschritten und Entdeckungen möglich, die

die verschiedene Farbstoffabsorption von X- und Y-chromosomhaltigen Spermien miteinbeziehen. Dies wurde früh diskutiert in U.S. Patent Nr. 4362246 und signifikant erweitert durch die Techniken, wie sie von Lawrence Johnson in U.S. Patent Nr. 5135759 offenbart wurden. Die Johnson-Technik der Nutzung der Flußzytometrie, um X- und Y-chromosomhaltige Spermien zu trennen, war ein solch signifikanter Fortschritt, daß sie zum ersten Mal die kommerzielle Trennung von Spermien möglich gemacht hat. Während es noch im experimentellen Stadium ist, hat die Trennung signifikant verbessert werden können durch die Nutzung von Hochgeschwindigkeitsflußzytometern wie dem MoFlo® Flußzytometer, das von Cytomation, Inc. hergestellt wird, und in einer Reihe von anderen Patenten, wie U.S. Patent Nr. 5150313, 5602039, 5602349, und 5643796 sowie der internationalen PCT-Patentveröffentlichung WO 96/12171 diskutiert wurde. Während der Gebrauch von Zytometern große Steigerungen der Geschwindigkeit ermöglicht hat und obwohl diese Geschwindigkeitssteigerungen besonders relevant sind im Hinblick auf die hohe Anzahl von Spermien, die oft verwendet wird, sind bestimmte Probleme trotzdem geblieben. Trotz des durch das MoFlo® Flußzytometer ermöglichten zehnfachen Geschwindigkeitsfortschritts sind immer kürzer und kürzere Sortierungszeiten aufgrund mehrerer Gründe gewünscht worden. Erstens ist als eine praxisrelevante Sache entdeckt worden, daß Spermien zeitkritische Zellen sind. Sie verlieren ihre Effektivität, je länger sie nicht benutzt bleiben. Zweitens hat das Sammeln, das Sortieren und Befruchtungszeitpunkt die Geschwindigkeit zu einem Punkt von hoher kommerzieller Bedeutung gemacht. Daher hat die zeitkritische Natur der Spermazellen und des Prozesses die Geschwindigkeit zu einem essentiellen Element bei der Erzielung von hoher Wirksamkeit und Erfolgsraten gemacht.

Es existieren auch andere Probleme, die sich von der praktischen bis zur theoretischen Seite erstrecken. Auf der praktischen Seite ist gewünscht worden, geschlechtssortierte Spermaproben mit Hilfe von billigen Wegwerfkomponenten und -substanzen zu erhalten. Auch auf der Ausgabenseite ist es gewünscht worden, die Sortierung (sowie die Sammlung und die Befruchtung) als ein so effizientes Laborereignis wie möglich zu gestalten. Daher können für die kommerzielle Produktion und den Erfolg in diesem Gebiet Verbesserungen, welche auch nur eine Steigerung in der Effizienz bedeuten, noch signifikant sein. Verbunden mit dem praktischen Aspekt der



30.05.00

DE 198 82 943 T1

- 4 -

Ausgaben ist der praktische Aspekt der Feinheit und Empfindlichkeit des gesamten Prozesses. In dieser Hinsicht ist es gewünscht worden, den Prozess zu vereinfachen und ihn prozedural so robust wie möglich zu machen, so daß Fehler des Durchführenden oder das Fachwissen eine immer unbedeutendere Rolle spielen können. Sie zusammengenommen machen Befruchtungen mit niedrigeren Dosierungen noch wünschenswerter. Zusätzlich zur Empfindlichkeit des Verfahrens ist immer schon bekannt gewesen, daß die Spermien als solche extrem empfindliche Zellen sind. Während dieser Faktor beim ersten Anblick als sehr leicht verständlich eingeschätzt werden könnte, ist tatsächlich das volle Ausmaß der Empfindlichkeit der Zellen nicht vollständig erforscht. Im Zusammenhang mit der Flußzytometrie im allgemeinen sind die meisten Zellen oder Partikel oft sphärisch oder auf andere Weise physikalisch geeignet gewesen, um einer Anzahl von Beanspruchungen zu widerstehen. Dies ist nicht der Fall für Spermazellen. In der Tat kann, wie die vorliegende Erfindung offenbart, die Behandlung durch normale Flußzytometertechniken tatsächlich unakzeptabel für das zytometrische Sortieren von Spermazellen in bestimmten Anwendungen sein. Die Empfindlichkeiten erstrecken sich von Verdünnungsproblemen über der dem Flußzytometer inhärenten Notwendigkeit, jede Zelle individuell zu isolieren und zu unterscheiden, bis auch zwischen dem Druck und anderen Streßfaktoren die auf die Zellen oder andere Substanzen, die sortiert wurden, ausgeübt wurden, welche die typische Flußzytometrie vor der vorliegenden Erfindung aufwies. Dies kann auch einen einzigartigen Faktor für Spermazellen darstellen, weil es anscheinend so ist, daß sogar obwohl die Spermazelle anscheinend durch das Flußzytometer laufen kann und ohne visuell unterscheidbare Seiteneffekte sortiert wird, die Zellen als solche tatsächlich aber auf eine Art beansprucht worden sind, daß sie im Befruchtungsprozess nicht mehr optimal angewendet werden können. Daher scheint ein Zusammenspiel von Faktoren beteiligt und es sind unübliche Probleme aus der Perspektive der Spermazellensortierung und des schließlichen Einsatzes für die künstliche Befruchtung aufgekommen.

Ein weiteres Problem, das bestehen bleibt – trotz der großen Fortschritte, die durch das Johnson-Patent und die damit verbundene Technologie erzielt wurden – ist die Tatsache, daß es vor der vorliegenden Erfindung extrem schwierig war, niedrig dosierte Befruchtung mit geschlechtsspezifischen Spermien zu erreichen, unbeachtlich der angewendeten Trennungstechni-

30.05.00

DE 198 82 943 T1

- 5 -

ken. Obwohl historisch gesehen einige Erziehungen solcher niedrigdosierten Befruchtungen aufgetaucht sind, scheint in mehr theoretischer oder Laborumgebung dies der Fall gewesen zu sein, eher als in Umgebungen, für welche eine kommerzielle Anwendung anwendbar oder wahrscheinlicherweise in Betracht kommt. In dieser Hinsicht war der Wunsch nicht nur, niedrig dosierte Befruchtung zu erreichen, sondern eher niedrig dosierte Befruchtung zu erreichen mit Schwangerschaftserfolgsraten, welche vergleichbar mit denen sind, die mit bereits existierenden geschlechtsunspezifischen hochdosierten künstlichen Befruchtungsversuchen erzielbar sind. Daher stellen die von den vorliegenden Erfindern erreichten Fortschritte in sowohl der geschlechtsspezifischen als auch der niedrig dosierten künstlichen Befruchtung signifikante Fortschritte dar, die zum ersten Mal kommerzielle Anwendungen möglich erscheinen lassen.

Ein weiteres Problem, das in der Industrie aufgetreten ist – wieder trotz der großen Fortschritte des Johnson-Patents und der damit verbundenen Technologie – ist die Tatsache, daß das Problem als solches, nämlich die künstliche Befruchtung mit hohen Erfolgsraten von statistischer Natur ist, in welchem anscheinend eine Vielzahl von Faktoren zusammenspielen. Daher können die vorgeschlagenen Lösungen zu einem bestimmten Grad eine Kombination von Faktoren einbeziehen, welche bei ausgiebigem statistischen Studium entweder isoliert oder in Kombination mit anderen Faktoren als notwendig bestimmt werden können. Solch eine Bestimmung beinhaltet desweiteren die Tatsache, daß die Ergebnisse als solche entsprechend der Art variieren und schwierig sicherzustellen sind, wegen der Tatsache, daß das Testen und das statistische Erproben auf einer Datenbasis, die groß genug ist, in den ersten Schritten nicht der Mühe wert erscheint. Aufgrund dieser Gründe kann die vorliegende Erfindung auch die Kombination von Faktoren einbeziehen, die individuell oder in Kombination die geeigneten Lösungen für eine gegebene Anwendung repräsentieren. Diese Offenbarung soll folglich als breit genug angesehen werden, so daß vielfältige Kombinationen und Permutationen der offenbarten Techniken erreicht werden können. Noch unentdeckte Synergien können mit weiteren Faktoren existieren. Solche Faktoren können sich erstrecken von Faktoren innerhalb des Sortierens oder vielleicht, Flußzytometers, Schritte zu solchen in der Sammlung als auch Befruchtungsschritte. Gegenwärtig sind Studien hauptsächlich über Rinderspezies erhalten worden, jedoch wird nicht geglaubt,

30.08.00

- 6 -

DE 198 82 943 T1

daß diese Techniken auf diese Spezies oder aufgrund dieser Dinge auf lediglich Spermazellen begrenzt sind. Es erscheint so, daß die gebrauchten Techniken Anwendungen über lediglich Spermazellen hinaus in Gebiete haben, welche entweder das Sortieren von empfindlichen Gegenständen oder eher die Minimierung der Auswirkungen der Beanspruchungen der Flußzytometrie auf die sortierten Gegenstände erfordern.

Die vorliegende Erfindung geht so vor, daß sie die Auswirkungen des Sortierens oder der Beanspruchung der Spermazellen minimiert. Interessanterweise haben andere tatsächlich Schritte von dieser Richtung weg unternommen, indem sie Drücke und die Anforderungen an die Geschwindigkeit und andere solcher Durchführungsarten erhöhen. Im wesentlichen können die Motivation für die niedrig dosierte Befruchtung und das Hochgeschwindigkeitsverfahren, in einer individuellen oder vielleicht zusammenhängenden Weise, Probleme gestellt haben, welche einander limitieren. Während also eine lang schon bemerkte aber nicht befriedigte Notwendigkeit für Hochgeschwindigkeits-, niedrig dosierte geschlechtsspezifische Befruchtung bestanden hat und während das zur Ausführung benötigte Fachwissen und die Elemente lang schon zur Verfügung gestanden haben, wurden vor der vorliegenden Erfindung die Fortschritte oder vielleicht die Kombinationen der Fortschritte anscheinend von den Fachleuten in diesem Gebiet übersehen. Vielleicht haben sie es bis zu einem gewissen Grade außer acht gelassen, daß das Problem ein Zusammenspiel von Faktoren und auch spezielle Notwendigkeiten für die Typen von Zellen (Spermazellen oder vielleicht speziesspezifische Spermazellen), die in diesem Gebiet vorhanden sind, miteinbezieht. Interessanterweise haben, wie die Auflistung der früheren Versuche in dieser Diskussion zeigt, substantielle Versuche stattgefunden, aber sie haben es offensichtlich nicht geschafft, das Problem, das solchen Gebieten wie niedrig dosierten geschlechtsspezifischen Befruchtungen inhärent ist, zu verstehen und haben vielleicht angenommen, weil das natürliche Leistungsereignis Milliarden von Spermazellen benötigt, es physikalische Begrenzungen zum Erreichen der künstlichen Befruchtung gibt, mit einer Anzahl, welche etwa vier Größenordnungen kleiner ist. Daher mag es nicht überraschend sein, daß es bis zu einem gewissen Grade ein tatsächliches Wegführen von der technischen Richtung gegeben hat, in welche die Erfinder der vorliegenden Erfindung gegangen sind. Vielleicht können die Ergebnisse sogar bis zu einem gewissen Grade als

30.05.00

DE 198 82 943 T1

- 7 -

unerwartet eingestuft werden, weil sie gezeigt haben, daß geschlechtsspezifische niedrig dosierte künstliche Befruchtung mit Erfolgsraten erreicht werden kann, die mit solchen von geschlechtsunspezifischer hochdosierter künstlicher Befruchtung vergleichbar sind. Es mag sogar für Einige überraschend sein, daß die Techniken und Fortschritte der vorliegenden Erfindung tatsächlich kombinieren, um die gezeigten großartigen Ergebnisse zu erhalten. Während jede Technik isoliert für sich betrachtet von Einigen als nicht bemerkenswert angesehen werden könnte, ist es tatsächlich so, daß es anscheinend subtile Änderungen braucht, um signifikante Fortschritte im Endresultat zu erzeugen – sowohl einzeln für sich betrachtet oder in Kombination mit anderen subtilen Änderungen.

Daher war vor der vorliegenden Erfindung das Erreichen von Erfolgsraten für die niedrig dosierte geschlechtsspezifische künstliche Befruchtung mit notwendigen Durchführungsniveaus oder vereinfachten Prozeduren, die wahrscheinlich notwendig waren, um kommerzielle Implementierung zu erreichen, nicht möglich. Neben der niedrig dosierten geschlechtsspezifischen Befruchtung auf einem kommerziellen Level, die erreicht wurde, offenbart die vorliegende Erfindung jedoch auch Techniken, welche das Erzielen von verbesserten Leistungen ermöglicht und daher das gewünschte Endresultat vereinfacht, nämlich niedrig dosierte geschlechtsspezifische künstliche Befruchtung auf einer kommerziellen Basis.

### III. Offenbarung der Erfindung

Entsprechenderweise beansprucht die vorliegende Erfindung das Erzielen, im kommerziellen Maßstab, von niedrig dosierter Befruchtung und die Resultate, wie sie zur Vorherbestimmung des Geschlechts des Säugetiers angewandt wurden. Sie stellt auch verbesserte Füll- und Sammlersysteme zur Sortierung von Spermazellen zur Bestimmung ihres Geschlechts durch die Flußzytometer-Trennungstechnik zur Verfügung. Bei dieser Trennungstechnik wird die umgebende Flüssigkeit, wie sie typischerweise in Flußzytometern benutzt wird, ersetzt durch eine Flüssigkeit, die die Beanspruchung der Spermazellen minimiert, während sie sortiert werden. Desweiteren wird das Sammlungssystem verbessert, um sowohl die physikalische als auch die chemische Beanspruchung, der die Zellen unterworfen sind, zu minimieren. Vielfältige Techniken und Substanzen sind dargestellt, aber wie der Fachmann auf diesem Gebiet leicht verstehen wird, können vielfäl-

30.05.00

- 8 -

DE 198 82 943 T1

tige Kombination und Permutationen in einer Weise benutzt werden, die für die Leistung basierend auf den Spezies, der Trennungstechnik, den Zielen und anderer Parameter, die in einer spezifischen Bearbeitungsanwendung einbezogen sind, optimiert werden können.

Eine Aufgabe der Erfindung ist daher, geschlechtsspezifische Befruchtungen mit niedrigerer Dosierung in einer Weise zu erreichen, welche unter realistischen kommerziellen Umständen funktioniert. Eine Aufgabe ist auch, bessere Sortierungen für Substanzen wie Spermazellen zu erreichen. Ein damit zusammenhängendes Ziel ist, den Einfluß, den die Sortierungsfunktion als solche auf die Zellen oder andere empfindliche Gegenstände, welche sortiert werden können, hat, zu minimieren. Für eine Flußzytometrie-Sortierungstechnik ist ein spezielles Ziel, den Einfluß, den die Hüllflüssigkeit auf die Zellen ausübt, zu minimieren und potentiell eine Hüllflüssigkeit bereitzustellen, die in positiver Weise den Zellen bei der Verarbeitung der verschiedenen Beanspruchungen hilft. Ein paralleles Ziel ist, Substanzen und Techniken bereitzustellen, welche speziell für Spermazellen im allgemeinen geeignet sind, für Rinderspermazellen, für Pferdespermazellen und für die Trennung von solchen Spermazellen in X- und Y-chromosomtragende Komponenten. In ähnlicher Weise ist auch ein Ziel, die Auswirkungen, die die Sammelphase (z.B. nach der Sortierung) auf die Zellen hat, zu minimieren und sowohl die physikalischen Auswirkungen als auch die chemischen Auswirkungen auf solche geschlechtsausgewählte Spermazellen zu minimieren. Daher ist ein Ziel, ein Sortierungsergebnis zu erhalten, daß so unbeeinflusst wie möglich ist.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist, eine niedrig dosierte, sortierte Befruchtung auf einem Niveau und mit Erfolgsraten zu erreichen, die mit denen von typischen geschlechtsunspezifischen hochdosierten künstlichen Befruchtungen vergleichbar sind. In Verbindung mit dieser Aufgabe ist es ein Ziel, ein umfassendes System für die künstliche Befruchtung zu präsentieren, welches diese Aufgabe in einer kommerziell praktischen Manier erreichen kann. Daher sind die primären Ziele der Minimierung der Beanspruchungen oder der potentiellen Schäden der Spermazellen wichtig. Das Sortieren in einer Weise, welche sowohl hohe Geschwindigkeit als auch Sortieren unter geringer Beanspruchung leistet und welche speziell für das Sortieren von Spermazellen in einem niedrig dosierten Zusammenhang ad-

30.05.00

DE 198 82 943 T1

- 9 -

aptiert ist, ist auch ein wichtiges Ziel. Die Ziele der Bereitstellung von Hüll- oder anderen Flüssigkeiten, welche die Fruchtbarkeit des Spermas nicht negativ beeinflussen und welche mit der künstlichen Befruchtung kompatibel sind, sind auch wichtig.

Natürlich sind weitere Aufgaben der Erfindung in anderen Bereichen der Beschreibung und der Ansprüche offenbart.

#### IV. Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Figur 1 ist ein schematisches Diagramm eines Sortiersystems entsprechend der Flußzytometer-Trennungstechnik der vorliegenden Erfindung.

Figur 2 ist ein Diagramm der sich im Bereich des freien Fall befindenden Zellen eines typischen Flußzytometers.

Figur 3 ist ein begriffliches Diagramm, das die Unterschiede, wie sie als Resultat der vorliegenden Erfindung auftreten, im Groben zeigt.

Figur 4 ist ein Diagramm des sortierten Zellstroms, wie sie im Bereich der Landungszonen gesammelt werden.

#### V. Beste Vorgehensweise zur Durchführung der Erfindung

Wie noch zu sehen sein wird, können die grundlegenden Konzepte der vorliegenden Erfindung in einer Vielzahl von Arten kombiniert und ausgeführt werden. Die Erfindung bezieht lediglich die kommerzielle, praktische, niedrigdosierte geschlechtsspezifische Befruchtung und deren Resultate mit ein. Für Flußzytometrietrennungstechniken bezieht die Erfindung auch sowohl verbesserte Flußzytometersysteme als auch Systeme für die Herstellung von geschlechtsspezifischen Spermaproben, welche in künstlicher Befruchtung eingesetzt werden können, und die Tiere, die mittels solcher Techniken hergestellt werden können, mit ein. Die Erfindung enthält umfassende Prozesse, durch welche hohe Erfolgsraten selbst in kommerziellen Umgebungen möglich sind. Des weiteren sind die Techniken in einer allgemeinen Weise offenbart, so daß sie auf spezifische Systeme und Anwendungen angewendet werden können, sobald die allgemeinen Prinzipien verstanden sind. Obwohl Verbesserungen von Vorrichtungen offenbart sind, sollte verstanden werden, daß diese Verbesserungen nicht lediglich be-

30.05.00

DE 198 82 943 T1

- 10 -

stimmte Methoden betreffen, sondern in einer Vielzahl von Arten variiert und kombiniert werden können. Wichtigerweise soll jede dieser Tatsachen so verstanden werden als daß sie von dieser Offenbarung erfaßt wird.

Wie erwähnt, ist das grundlegende Ziel das der Trennung der X-tragenden Spermien von den Y tragenden Spermien. Dies wird in einer Weise durchgeführt, welche die zwei Typen von Spermien isoliert, so daß jedes separat verpackt und behandelt werden kann. Gegenwärtig wird diese Isolierung bevorzugterweise mittels Gebrauch der Flußzytometrie durchgeführt. Die Flußzytometrie im allgemeinen ist eine Technik, welche sehr gut verstanden ist. Zum Beispiel sind ihre grundlegenden Aspekte in einer Vielzahl von Patenten von Cytomation, Inc., wie z.B. in den US-Patenten oder früher aufgelisteten anderen Publikationen gezeigt und diskutiert. Jedes dieser Patente und die darin zitierten Verweisungen sind hiermit in die vorliegende Anmeldung eingeschlossen; daher kann der Fachmann auf diesem Gebiet sehr leicht die beteiligten grundlegenden Prinzipien verstehen.

Im wesentlichen umfaßt die Flußzytometrie das Sortieren von Gegenständen, wie Zellen, mit, welche dem Flußzytometerinstrument durch eine Art einer Zellquelle bereitgestellt werden. Ein begriffliches Instrument ist in Figur 1 gezeigt. Das Flußzytometerinstrument umfaßt eine Zellquelle (1), welche Zellen oder andere Typen von Gegenständen, die analysiert werden sollen, dem Flußzytometer bereitstellt oder zuführt. Die Zellen sind in einer Düse (2) in einer Weise deponiert, daß diese Zellen von einer Hüllflüssigkeit (3) umgeben sind. Die Hüllflüssigkeit (3) wird gewöhnlich von einer Hüllflüssigkeitsquelle (4) zugeführt, so daß während die Zellquelle (1) die Zellen zuführt, die Hüllflüssigkeit (3) gleichzeitig durch die Düse zugeführt wird. Auf diese Weise kann leicht verstanden werden, daß die Hüllflüssigkeit (3) eine Hüllflüssigkeitsumgebung für die Zellen schafft. Weil die verschiedenen Flüssigkeiten dem Flußzytometer mit gewissem Druck zugeführt werden, fließen sie aus der Düse (2) und treten aus der Düsenöffnung (5) aus. Durch das Bereitstellen einer Art von Oszillator (6), welcher sehr präzise mit Hilfe einer Oszillatorkontrolle (19) kontrolliert werden kann, können Druckwellen innerhalb der Düse (2) eingestellt werden und auf die Flüssigkeiten, die aus der Düse (2) bei der Düsenöffnung (5) austreten, übertragen werden. Weil der Oszillator (6) daher auf die Hüllflüssigkeit (3) wirkt, formt der aus der Düsenöffnung (5) austretende Strom (7) schließlich

regelmäßige Tropfen (8). Weil die Zellen sich in einer Hüllflüssigkeitsumgebung befinden, können die Tropfen (8) individuell isolierte Zellen oder andere Gegenstände enthalten.

Weil die Tropfen (8) im allgemeinen isolierte Zellen enthalten, kann das Flußzytometer Tropfen auf der Basis unterscheiden und separieren ob oder ob nicht die geeignete Zelle oder die geeigneten Zellen im Tropfen ist/sind. Dies wird erreicht durch ein Zellsensorsystem (9). Das Zellsensorsystem (9) beinhaltet zumindest eine Art von Sensor (10), welcher auf die in jedem Tropfen (8) enthaltenen Zellen anspricht, wie in der Seminalarbeit (kein Wortspiel beabsichtigt) von Larry Johnson, nämlich US-Patentnummer 5135759 ausführlich diskutiert ist. Wie das Johnson-Patent für Spermazellen erklärt, kann das Zellsensorsystem (9) eine Handlung auslösen, in Abhängigkeit von der relativen Anwesenheit oder relativen Abwesenheit eines bestimmten Farbstoffes, welcher mit Hilfe von Stimulantien wie dem Laserexciter (11) angeregt werden kann. Während jeder Typ von Spermazelle von dem Farbstoff eingefärbt ist, verursachen die verschiedenen Längen des X-Chromosoms und des Y-Chromosoms verschiedene Grade der Einfärbung. Daher ist es durch die Bestimmung des Grades an Farbstoff, der in der Spermazelle vorhanden ist, möglich, zwischen X-tragenden Spermien und Y-tragenden Spermien mit Hilfe ihrer unterschiedlichen Emissionsgrade zu unterscheiden.

Um die schließliche Trennung und Isolierung der geeigneten Zellen in einer Flußzytometertrennungstechnik zu erreichen, werden die vom Sensor (10) erhaltenen Signale einer Art von Sortierungs/Unterscheidungssystem (12) zugeführt, welches sehr schnell eine Entscheidung trifft, und welches in unterschiedlicher Weise jeden Tropfen (8) basierend darauf, ob es entschieden hat, daß die gewünschte Zelle innerhalb dieses Tropfens (8) existiert oder nicht existiert, aufladen kann. In dieser Weise agiert das Sortierungs/Unterscheidungssystem (12) so, daß die elektrostatischen Ablenkungsplatten (13) die Tropfen (8) basierend darauf, ob sie die geeignete Zelle oder den anderen Gegenstand enthalten oder nicht, ablenken können. Als Resultat agiert das Flußzytometer zur Sortierung der Zellen dadurch, daß es sie veranlaßt, in einem oder mehreren Sammlern (14) zu landen. Daher kann das Flußzytometer durch die Feststellung von Eigenschaften der Zellen oder der anderen Gegenstände zwischen den Zellen auf der Basis



30.06.00

DE 198 82 943 T1

- 12 -

eines speziellen Charakteristikums unterscheiden und kann diese in den geeigneten Sammler (14) platzieren. In dem System, das gegenwärtig zur Sortierung von Sperma benutzt wird, werden die X-tragenden Spermientropfen positiv aufgeladen und daher in eine Richtung abgelenkt, die Y tragenden Spermientropfen werden negativ aufgeladen und daher in die andere Richtung abgelenkt und der Abfallstrom (d.h. nicht sortierbare Zellen) wird nicht aufgeladen und wird daher in einem nicht abgelenkten Strom in einer Saugröhre oder Ähnlichem gesammelt.

Mit Bezug auf Figur 2 kann der Prozeß sogar noch weiter verstanden werden. Wie in dieser Figur gezeigt ist, emittiert die Düse (2) einen Strom (7), welcher aufgrund des Oszillators (6) (nicht in Figur 2 gezeigt) Tropfen (8) formt. Weil die Zellquelle (1) (nicht in Figur 2 gezeigt) Spermazellen (15) zuführen kann, welche entsprechend der Johnson-Technik angefärbt wurden, wird die Lichtstimulation durch den Laserexciter (11) in unterschiedlicher Weise vom Sensor (10) bestimmt, so daß die Existenz oder Nichtexistenz einer Ladung auf jedem Tropfen (8) wenn er sich vom Strom (7) trennt, vom Flußzytometer kontrolliert werden kann. Diese Kontrolle resultiert in positiv aufgeladenen, negativ aufgeladenen und ungeladenen Tropfen (8), basierend auf ihrem Inhalt. Wie in Figur 2 gezeigt, sind bestimmte Tropfen als abgelenkte Tropfen (16) gezeigt. Diese abgelenkten Tropfen (16) sind solche, die Spermazellen (15) des einen oder anderen Geschlechts enthalten. Sie werden dann in einen geeigneten Sammler (14) für den späteren Gebrauch deponiert.

Einer der Aspekte der Flußzytometrie, welcher von besonderer Wichtigkeit für ihre Anwendung für die Spermasortierung ist, ist die Hochgeschwindigkeitsfunktionsweise eines Flußzytometers. Fortschritte sind speziell durch die Flußzytometer gemacht worden, die über Cytomation, Inc. unter der MoFlo®-Marke erhältlich sind. Diese Flußzytometer haben die Sortierungsgeschwindigkeiten außergewöhnlich stark gesteigert und haben so die Flußzytometrie zu einer Technik gemacht, die wahrscheinlich die kommerzielle Anwendung der Spermasortierung (unter anderen kommerziellen Anwendungen) möglich macht. Mit ihnen kann Hochgeschwindigkeitssortierung erreicht werden, d.h. eine Geschwindigkeit, welche wesentlich höher liegt als die anderwärts gebrauchte. Spezifisch arbeiten Cytomations MoFlo®-Zytometer mit Oszillatorfrequenzen, die größer als etwa 5 kHz

30.05.00

- 13 -

DE 198 82 943 T1

sind und noch spezifischer können sie auch in den 10 bis 30 oder sogar in den 50 kHz-Bereichen betrieben werden. Daher werden Tröpfchen mit sehr hoher Frequenz gebildet und die Zellen, die innerhalb der Hüllflüssigkeitsumgebung darin enthalten sind, können sehr schnell von der Düse (2) emittiert werden. Daher kann im Ergebnis jede der Komponenten wie die Düse (2), der Oszillator (6) und ähnliches, welche das Flußzytometersystem aufbauen und Teil davon sind, so konfiguriert oder ausgewählt werden, daß ein Hochgeschwindigkeitszellsortierer resultiert. Bei der Anwendung eines Hochgeschwindigkeitszellsortierers auf die Sortierung von Spermazellen können Sortierungsgeschwindigkeitsraten von größer als etwa 500 Sortierschritten pro Sekunde erreicht werden. Tatsächlich sind bereits Sortierraten in den 1000er und 1200er Bereichen durch die Benutzung von Hochgeschwindigkeitszellsortierern erreicht worden. Es sollte wichtigerweise verstanden werden, daß der Begriff "Hochgeschwindigkeits-" ein relativer Begriff ist, so daß wenn andere Vorteile in der Flußzytometrie und spezifische Anwendungen erreicht werden, der Aspekt, welcher als "hoch" bezeichnet wird, variieren kann oder auch absolut bleiben kann. In jeglicher Definition ist das allgemeine Prinzip das, daß das Sortieren mit Raten erfolgt, bei welchen die Parameter der physikalischen Charakteristiken des Flußzytometers signifikant zu den Zellen selbst sind, wenn spezielle Zellen wie Spermazellen sortiert werden. Ein Aspekt der Hochgeschwindigkeitssortierung, welcher bei der Sortierung von Spermazellen durch eine Flußzytometer-trennungstechnik ins Spiel kommt, ist der der Drücke und anderen Beanspruchungen, welchen die Spermazellen innerhalb des Zytometers ausgesetzt sind. Z. Bsp. können Flußzytometer, wenn sie bei hoher Geschwindigkeit (und einer alternativen Definition von "hoher Geschwindigkeit") arbeiten, bei einem Druck von 50 PSI und sogar 60 und mehr PSI betrieben werden. Diese Drücke können als hoch eingestuft werden, weil sie Effekte auf die zu sortierenden Zellen haben können. Der Schlüssel wie in der vorliegenden Erfindung offenbart, für diese Seite der Erfindung ist die Tatsache, daß die Beanspruchungsgrenzen der speziellen Zellen der bestimmende Faktor sind. Zusätzlich kann, wenn weiteres Wissen gewonnen wird, gezeigt werden, daß die Beanspruchungsgrenzen eine Funktion von kombinierten Effekten wie der speziellen Spezies oder der speziellen Vor- oder Nachbehandlung der Zellen, ist. Der Schlüssel in dieser Hinsicht ist, daß die auf die Zellen ausgeübte Beanspruchung tatsächlich ihre Lebensfähigkeit und ihre Fähigkeit, ein gewünschtes Ergebnis zu erzielen, beeinträchti-

30.06.00

DE 198 82 943 T1

- 14 -

gen kann. Im Falle des Drucks kann es sein, daß das bloße Aussetzen der Spermazellen unter einem höheren Druck sich als Ergebnis des Betriebs des Flußzytometers bei diesem Druck in einer reduzierten Leistungsfähigkeit der Zellen auswirken kann. Die vorliegende Erfindung agiert in einer Hinsicht, um diese Beanspruchungen zu minimieren und erzielt daher sowohl größere Wirksamkeiten als auch geringere Dosierungen wie später diskutiert. Unter Inbetrachtziehung des Beanspruchungsaspekts der Zellen agiert die vorliegende Erfindung in einer Weise, die diese Beanspruchungen minimiert. Diese Beanspruchungen können zu jeder Zeit im Gesamtzyklus oder im Prozeß der Sammlung, des Sortierens oder sogar der Befruchtung des Tieres minimiert werden. Wichtigerweise erscheint die Beanspruchung der Zellen, der diese durch die Behandlung innerhalb des Flußzytometers ausgesetzt sind als signifikant für diese Anmeldung. In einer Ausführungsform der Anmeldung ist die Hüllflüssigkeit spezifisch ausgewählt, so daß sie zur Abstimmung mit der Vorsortierungszellflüssigkeitsumgebung oder der Nachsortierungszellflüssigkeitsumgebung oder beiden dienen kann. Obwohl es klar ist, ist es möglich entweder die Vor- oder die Nachsortierungsflüssigkeit anzupassen, in einer Ausführungsform paßt die Erfindung die Hüllflüssigkeit (3) so ein, daß sie signifikant weniger Beanspruchung auf die Zellen ausübt als vorher erreicht worden ist. In einer Hinsicht ist die Erfindung bemerkenswert, nämlich daß sie den Gesamtfokus von der Betriebsweise des Flußzytometers zu einem Fokus auf die Behandlung und die Abwendung von Beanspruchung der Zellen als solche verschiebt. Zum Beispiel erkennt die vorliegende Erfindung, während es bekannt war, Flüssigkeiten mit einem eigenen pH-Faktor oder Osmoalität zu verwenden, es bestimmte chemische Zusammensetzungen geben kann, auf welche die Zellen hyper-ansprechempfindlich sind. Diese hyper-ansprechempfindlichen chemischen Zusammensetzungen können natürlich basierend auf den Zellen oder sogar auf der Vorbehandlung der Zellen variieren. Wichtigerweise erscheint es zur Zeit so, daß für Spermazellen bestimmte metabolische chemische Zusammensetzungen wie Zitrat unüblich hohen Beanspruchungen der Zellen vorzubeugen scheinen. Daher können die hyper-ansprechempfindlichen chemischen Zusammensetzungen so definiert werden, auf welche die Zellen besonders ansprechen im Zusammenhang mit ihrer Funktionalität und der dann existierenden Handhabungstechniken. Was Spermazellen anbelangt scheint es so zu sein, daß metabolische Zusammensetzungen speziell Zitrat-Konstanzen für Rinderspermazellen und

30.05.00

DE 198 82 943 T1

- 15 -

Hepes-Puffer-Konstanzen für Pferdespermazellen sehr wichtig sein können. Daher agiert die vorliegende Erfindung so, daß die Veränderungen durch den Typ der Betriebsweise minimiert werden oder über die Auswahl von Substanzen, welche als Mittel zur Minimierung der Veränderungen, welcher die Zellen ausgesetzt sind, wirksam sein können.

Als Hüllflüssigkeit wird entsprechend einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung eine Substanz so ausgewählt, daß sie chemisch angepaßt sein kann, um minimale Veränderungen zu bewirken. Daher kann das Gesamtergebnis des Sortiervorgangs durch die Auswahl der geeigneten Hüllflüssigkeit nicht nur im Bezug auf die Flußzytometrieparameter sondern auch im Bezug auf die Zellparameter als solches und den Veränderungen, denen die Zellen ausgesetzt sind, verbessert werden. Dies wird konzeptuell in Figur 3 gezeigt. Figur 3 begrifflich zeigt eine Art von chemischem Faktor (sowie Zitrat oder andere Faktoren), wie es in den verschiedenen Phasen des Prozesses vorkommen kann. Zum Beispiel können die vier nachfolgend gezeigten Phasen für eine Flußzytometrientrennungstechnik repräsentierend aber nicht so begrenzend sein: Phase I kann die Existenz von Zellen innerhalb der Zellquelle (1) repräsentieren, Phase II kann die Existenz der Zellen, während sie in der Hüllflüssigkeitsumgebung sortiert sind, zeigen, Phase III kann die Zellen, während sie nach dem Sortieren gesammelt werden, zeigen, und Phase IV kann die in einem Speichermedium wiederhergestellten Zellen nach der Sortierung zeigen. Diese vier Phasen, wie sie für den Stand der Technik gezeigt sind, können erheblich unterschiedlichen chemischen Faktorumgebungen ausgesetzt sein. Wie konzeptionell gezeigt, können die Zellen in der vorliegenden Erfindung jedoch sehr geringen Veränderungen ausgesetzt sein, dabei ist am meisten hervorzuheben, daß das Eintauchen oder Tropfen, das zwischen den Phasen I und II stattfindet, kann nahezu nicht vorhanden sein. Dies ist ein Ergebnis der Auswahl der geeigneten Hüllflüssigkeit wie oben ausgeführt. Daher können die Zellen in der vorliegenden Erfindung einem erheblich geringerem Level der Beanspruchung unterworfen sein, wobei dies ein Resultat des Eingebettetseins einer geeigneten Hüllflüssigkeit ist.

Eine der potentiellen Verallgemeinerungen, die im Hinblick auf dieses Phänomen existieren können, ist die Tatsache, daß bestimmte chemische Zusammensetzungen stärker hyper-ansprechempfindliche chemische Zu-

30.05.00

DE 198 82 943 T1

- 16 -

sammensetzungen darstellen können als andere. Während dies natürlich aufgrund der Spermaspezies, der Behandlung oder sogar des Zelltyps variieren kann, scheint es so, daß die Lebensfähigkeit der Zellen für ihren beabsichtigten Gebrauch (hier die künstliche Befruchtung) stark variiert, natürlicherweise oder aufgrund des Sortierens oder beides, und so zeigen die Zellen einen hyper-ansprechempfindlichen Charakter im Hinblick auf diese chemische Zusammensetzung. Durch die Auswahl bestimmter metabolischer chemischer Zusammensetzungen erscheinen große Fortschritte möglich, vor allen Dingen durch Zitrats oder Chemikalien, die innerhalb des Zitronensäurezyklus liegen. Daher wird für die Rinderspermaanwendung die Hüllflüssigkeit (3) so ausgewählt und angepaßt, daß sie eine etwas 2,9%ige Natrium-Zitrat-Komposition darstellt. Spezifischerweise kann die 2,9%ige Natrium-Zitrat-Lösung folgendermaßen dargestellt werden:

1. Gebe 29,0 Gramm Natrium-Zitratdihydrat ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) in einem Kolben mit einem Volumen von 1000 ml
  - a. Löse Natrium-Zitrat in 3/4 einer Wassermenge, dann füge weiteres Wasser zum Volumen hinzu.
2. Füge deionisiertes oder Nanopurwasser bis zum Erreichen des 1000 ml-Endvolumens hinzu
3. Transferiere auf Flaschen und autoklaviere bei 15 lbs Druck (245°F) für mindestens 30 Minuten
  - a. Autoklaviere die Lösung unter Bedingungen, die eine Evaporierung minimieren (lose Bedeckung).
  - b. Sei vorsichtig, daß das Wasser nicht wegekocht.
4. Kühle langsam auf Raumtemperatur ab.
5. Stelle versiegelt in einem 5°C-kalten Raum auf Lager.

Des weiteren kann die Natrium-Zitrat-Lösung zur Benutzung als Hüllflüssigkeit filtriert werden.

6. Filtriere mit einem 0,22 µm-Filter unter Anwendung von aseptischen Techniken.

30.05.00

DE 198 82 943 T1

- 17 -

Interessanterweise leistet eine solche Zusammensetzung für Pferdespermazellen nicht dasselbe. Es wurde entdeckt, daß für Pferdespermazellen eher ein Hepes-gepuffertes Medium wie ein Hepesrindergametenmedium - speziell HBGM3 wie bereits von J.J. Parrish für eine Rinderanwendung kreiert - gut funktioniert. Dieses Medium wird im Artikel "Capacitation of Bovine Sperm by Heparin", 38 Biology of Reproduction 1171 (1988) diskutiert, welcher hiermit in die vorliegende Anmeldung mit einbezogen wird. Dies ist nicht nur überraschend weil es nicht derselbe Typ von Substanz ist wie er für Rindersperma verwendet wird, sondern weil der tatsächliche Puffer ursprünglich für eine Rinderanwendung entwickelt worden. Daher wird in der Pferdeanwendung die Hüllflüssigkeit ausgewählt, welche den Hepes-Puffer enthält. Diese Lösung kann bei Raumtemperatur einen pH-Wert von etwa 7,54 (pH bei 39°C=7.4) haben und die folgende Zusammensetzung:

<u>Chemikalie</u>	<u>Trockengewicht (g/500ml)</u>
CaCl <sub>2</sub>	0,145
KCl <sub>2</sub>	0,115
MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	0,004
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O	0,018
NaCl	2,525
NaPyruvat	0,011
Milchsäure (60%)	1,84 ml
HEPES	4,765
NaHCO <sub>3</sub>	0,420
BSA (Fraktion V)	3,0

Ein weiterer Aspekt, der in der vorliegenden Erfindung hereinspielen kann, ist die Tatsache, daß die beteiligten Zellen unübliche Sensitivitäten erleiden können. In einer Hinsicht kann dies durch die Tatsache verursacht sein, daß Spermazellen zu einer Klasse von Zellen gehören, die nicht-reparierende Zellen sind. Das heißt, sie haben nicht die Fähigkeit sich selbst zu reparieren und daher können sie eine weitaus feinfühligere Behandlung erfordern, als für Flußzytometer oder anderes Handhabungsequipment typisch ist. Daher kann es geeignet sein, daß die Erweiterung besonders anwendbar ist, wenn das Flußzytometer oder ein anderes Trennungsgesetz wirkt zur Her-

stellung einer Quelle von Spermazellen. Ein weiterer potentiell damit verbundener Aspekt, welcher einzigartig für eine Klasse von Zellen wie Spermazellen sein kann, ist die Tatsache, daß ihre DNA nicht-reparierend, nicht-replizierend, und nicht-transkribierend ist. Jeder dieser Faktoren kann ins Spiel kommen und deshalb können sie entweder individuell oder zusammen relevant sein. Daher kann es sein, daß die Lehren der vorliegenden Erfindung für alle Gametenzellen oder sogar für Viren und ähnliches, welche nicht-reparierende, nicht-translatierende und nicht-transkribierende Zellen sind, anwendbar sind.

Ein separater Aspekt der Bearbeitung mittels Flußzytometer, welcher ebenfalls wichtig sein kann, ist die Tatsache der richtigen Behandlung der Zellen nachdem sie sortiert sind, sowohl chemisch als auch physikalisch. Wie in Figur 4 gezeigt, kann, während die Zellen in dem Tropfen (8) im Sammler (14) landen, es wichtig sein, daß der Behälter, welcher den Sammler darstellt, die richtige Größe aufweist, so daß er als eine Art Mittel der Vermeidung eines Aufpralles zwischen den Zellen und dem Behälter selbst dient. Obwohl es bekannt war, eine ursprüngliche Sammlerflüssigkeit (17) in den Boden des Behälters zur Sammlung der Zellen zu plazieren, so daß sie nicht auf dem Boden des Behälters auftreffen, erscheint es, daß eine einfache Ausweitung des Behälters benutzt werden kann, um Variationen in der Strompräsentation sowie dem unvermeidlichen Spritzen aufgrund des Aufpralls der Zellen in den Behälter, zu begegnen, um das Ergebnis zu verbessern. In einer Hinsicht kann dies als eine Art Federungselement agieren, so daß Zellen, welche mechanisch zart sind, daß heißt, daß sie beim Auftreffen brechen oder beschädigt werden können, in geeigneter Weise behandelt werden können. So kann es wichtig sein, daß dann, wenn die Zytometerquelle die zu sortierenden Zellen einführt, die physikalisch feinen Zellen eine Art von Federungselement bereitstellen, die wie eine weite Sammelröhre für die die Öffnungsweite (18) dazu dient, die Wände des Behälters in einer Art zu positionieren, die den Kontakt mit den Zellen vermeidet. Daher bietet die Röhre keine Seitenwände, die so nah sind, daß irgendeine signifikante Wahrscheinlichkeit des Kontakts zwischen den zu sortierenden Zellen und den Wänden der Röhre besteht. Auf diese Weise kann es wünschenswert sein, ebenfalls eine weite Sammelröhre zusätzlich zur Sammelflüssigkeit (17) einzuschließen. Vielleicht kann das bloße Bereitstellen einer weiten Öffnung des Behälters, welcher als Teil des Samm-

30.05.00

DE 198 82 943 T1

- 19 -

lers (14) dient, ausreichend sein. Für Anwendungen, die die Hochgeschwindigkeitssortierung von Sperma betreffen, wurde herausgefunden, daß die Bereitstellung eines Behälters mit einem inneren Durchmesser von zumindest 15 mm angenommen wird, ausreichend zu sein. Spezifischerweise wurde entdeckt, daß es bei Benutzung einer 14 mm Falcon-Teströhre in einer solchen Anwendung nur minimale physikalische Schäden der Zellen als Ergebnis des Sammlers (14) gibt.

Es sollte angemerkt werden, daß sogar die 14 mm Falcon-Teströhre nicht das Optimum sein muß. Spezifischerweise wird geglaubt, daß das Design eines Sammelbehälters, welcher der Geometrie des Stromes angepaßt ist (d. heißt "ein Strom angepaßter Behälter" am optimalsten sein kann. Dieser Strom angepaßte Behälter kann jegliche oder alle der folgenden Charakteristiken besitzen:

Eine relative weite Öffnung, eine elliptisch geformte Öffnung, ein geringeres Höhe-zu-Weite Verhältnis als im Moment einbezogen, eine gewinkelte oder auf andere Weise angepaßte äußere Form, wie es vorhandene Seitenwände sein können, die parallel zum fallenden Strom sind, und ähnliches. Es kann auch wünschenswert sein, ein Montierungselement, wie ein bewegliches Element oder ein Medium wie ein Kugellager oder ähnliches bereitzustellen, um eine variable Orientierung der Röhre zu erlauben, so daß sie dem aufzusammelnden fallenden Strom angepaßt werden kann. Zusätzlich können die physikalischen Charakteristika für die Klasse der Behälter, wie die existierende Röhre (beschrieben als eine "Falcon-Typ" Teströhre, nicht nur die Weite der Röhre einschließen, sondern auch das Material (solches Polystyrol, an dem die Zellen nicht anhaften) aus welchem sie gemacht ist und ähnliches. (Diese Materialoptionen sind bekannt für die 14mm Falconröhre.) Daher können der Behälter und seine Sammelflüssigkeit auch als ein Abfederungselement dienen, um physikalischen Schaden der Zellen zu minimieren. Er kann auch durch seine Größe dazu dienen, die Sammlung einer geeigneten Anzahl von Spermien ohne einen signifikanten Verdünnungseffekt zu erleichtern. Bei der Sammlerflüssigkeit (17) kann die Tatsache sein, daß auch diese Flüssigkeit dazu dienen kann, die chemische Beanspruchung der Zellen zu minimieren. In einer Hinsicht, kann die Sammlerflüssigkeit (17) so ausgewählt werden daß sie ein angepaßtes Level an Nährstoffen bereitstellt, so daß die Levels sowohl vor als auch



30.05.00

DE 198 82 943 T1

- 20 -

nach der Sortierung ausgeglichen sind, weil es wichtig sein kann, den Zellen Nährstoffe sowohl vor als auch nach der Sortierung zur Verfügung zu stellen. Für Rindersperma, in welchem ein Nährstoff von Eidotterzytrat gebraucht wird bei einem Level von 2% Eidotter wurde entdeckt, daß der Gebrauch eines 6% Eidotterzytratlevels (d. heißt, 6% Eidottergehalt in einer Zytratlösung) gute Resultate ergibt. Dies ist ein Resultat der Volumina, die vor und nach dem Sortierungsvorgang existieren. Die Sammlerflüssigkeit (17) kann vor dem Sortieren mit einem Volumen von etwa 2 mm starten. Der Sortierungsvorgang kann etwa das Doppelte dieses Volumens hinzufügen (er endet dann beim 3-fachen des ursprünglichen Startvolumens) mit sehr wenig Eidotterzytrat in Lösung (aufgrund von Zusammenklumpen und anderer Flußzytometererwägungen). Daher kann aufgrund der beteiligten Volumina das Endresultat bezüglich des Levels der Menge an vorhandenem Eidotterzytrat equivalent dem Startergebnis sein, nämlich 2% Eidotterinhalt in einer Zytratlösung. Daher kann die Sammlerflüssigkeit (17) so ausgewählt werden, daß sie am Ende eine Sammlerflüssigkeitsumgebung herstellt, welche mit dem ursprünglichen Nährmittel oder der anderen Flüssigkeitsumgebung ausgeglichen ist. Auf diese Weise kann es dazu dienen, die Zeit und den veränderten Level der Zusammensetzung, dem die Zellen unterworfen sind, zu minimieren. Natürlich können diese Flüssigkeitsumgebungen innerhalb des Flußzytometers vorhanden sein oder können zu einer anderen früheren Zeit existieren, dabei ist der wichtige Punkt lediglich der, die Beanspruchung zu minimieren, denen die Zellen zu jeglicher Zeit ihres Lebenszyklusses unterworfen sind. Des weiteren, weil auch der ursprüngliche Gehalt an chemischer Substanz variiert werden kann (z.B. der Prozentgehalt an Eidotter kann im Zytrat nach oben oder unten variiert werden), kann ähnlich auch die Startsammlerflüssigkeitsumgebung oder verschiedene Volumina auch so variiert werden, daß das Endresultat das gleiche ist. Daher existiert vor dem Beginn des Sortierungsprozesses die Sammlerflüssigkeit mit einem 6% Eidottergehalt in der Zytratlösung und nach der Beendigung des Sortiervorgangs kann die Sammlerflüssigkeit mit dem geschlechtsspezifischen Sperma in einer 2% Eidottergehalt- Zytratlösung ähnlich zum ursprünglichen Nährmittelinhalt enden. Es sei angemerkt, daß im späteren Gebrauch diese Spermazellen so behandelt werden können, daß sich aus anderen Gründen ein 20%iger Eidottergehalt in der Zytratflüssigkeit ergibt, jedoch sind diese Änderungen nicht vorgesehen, um die Zellen zu beanspruchen, da sie lediglich einen bekannten Teil des Gesamtbe-

30.05.00

DE 198 82 943 T1

- 21 -

fruchtungsprozesses darstellen. Während natürlich die Gehalte, wie der Fachmann leicht versteht, variiert werden können, kann ein 20%iger Eidotterzytratpuffer wie folgt zusammengesetzt sein:

I. Endzusammensetzung:

80% Natriumcytratlösung (72mM)

20% (vol/vol) Eidotter

II. Zubereitung für 1 Liter:

A. Natriumcytratlösung

1. Platziere 29,0 Gramm Natriumcytratdihydrat  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  in einen Kolben mit 1000 ml Volumen
2. Füge deionisiertes oder Nanopurwasser hinzu, um zum Volumen von 1000 ml aufzufüllen.
3. Transferiere auf Flaschen und autoklaviere bei 15 lbs Druck (245°F) für zumindest 30 min.
  - a. autoklaviere die Lösung unter Bedingungen, die eine Evaporierung minimieren (lose Bedeckung).
  - b. sei vorsichtig, daß das Wasser nicht wegekocht.
4. Kühle langsam zur Raumtemperatur ab.
5. Bewahre versiegelt in einem 5° C kalten Raum auf.

B. Eipräparation

1. Besorge frische Hühnereier von einer guten kommerziellen Quelle.
2. Wasche die Eier frei von Schmutz (nutze nicht zu viele Detergenten) und spüle nach.
3. Lege die Eier für 2-5 Minuten in 70% Ethanol ein.

30.08.00

DE 198 82 943 T1

- 22 -

4. Hole die Eier heraus und lasse sie trocknen (oder reibe sie trocken) und bewahre sie auf einem sauberen Handtuch auf).

#### C. Zubereitung des Extenders

1. Benutze sterile, saubere Glasware.

#### 2. A-Fraktion (Nicht-Glyzerin Fraktion)

- a. Platziere 800mm einer 2,9% Natriumcytratlösung in einem 1000ml Meßzylinder.

- b. Antibiotische Level für die Nicht-Glyzerin enthaltende Fraktion (A-Fraktion) des Extenders können wie folgt sein:

I. Tylosin = 100µg/ml

II. Gentamicin = 500µg/ml

III. Linco-Spectin 0 300/600 µg/ml

- c. Füge 200 ml frisches Eidotter wie unten ausgeführt (Sektion D) hinzu.

I. Mische sehr stark.

- d. Dies stellt A-Fraktion Extender, basierend auf 2,9% Natriumcytratlösung mit 20% Eidotter und Antibiotika mit Konzentrationen, die bekannterweise nicht toxisch für Bullensperma sind, bereit.

- e. Der Extender kann über Nacht bei 5° aufbewahrt werden.

- f. Gieße den Überstand (obere 800ml) am nächsten Tag ab.

- g. Erwärme auf 37°C vor dem Gebrauch am nächsten Tag.

- #### D. Um Eidotter zu einer gepufferten Lösung hinzuzufügen, funktioniert die folgende Prozedur gut:

1. Wasche das Ei und säubere die Eier (siehe B oben)

30.05.00

DE 198 82 943 T1

- 23 -

2. Öffne das Ei und trenne das Eidotter vom Eiweiß unter Gebrauch eines Eidotterseparators. Alternativ dazu schütte das Eidotter zwischen den beiden Hälften der Schalen 2-3 mal vor und zurück. Lasse nicht die Membran um das Eidotter einreißen.
3. Platziere das Eidotter auf einem sterilen Stück 15 cm Filterpapier,
4. Halte das Filterpapier über den Meßzylinder, der den Puffer enthält und quetsche das Eidotter (zerreiß die Membran) und erlaube dem Eidotter aus dem gegoldeten Filterpapier in den Zylinder zu rinne. Typischerweise können etwa 12 bis 15 mm des Eidotters aus einem Ei erhalten werden.

Ein weiterer Aspekt der in die verschiedenen Faktoren der vorliegenden Erfindung hineinspielen kann, ist der des Gebrauchs von niedrig dosierten Mengen von Sperma für die künstliche Befruchtung oder ähnliches. Ein weiterer Hintergrund für den Aspekt der geschlechtsspezifischen künstlichen Befruchtung kann in "Prospects for Sorting Mammalian Sperm" von Rupert P. Amman und George E. Seidel, Jr., Colorado Associated University Press (1982) gefunden werden, dessen Inhalt hiermit in die folgende Anmeldung mit aufgenommen wird. Wie erwähnt, ist bei der natürlichen Befruchtung eine Anzahl von Spermien in der Ordnung von Milliarden von Spermien beteiligt. Die typische künstliche Befruchtung wird gegenwärtig mit Millionen von Spermien für Rinderspezies und Hunderten von Millionen von Spermien für Pferdespezies durchgeführt. Mit dem Ausdruck "niedrige Dosierung" ist gemeint, daß die Dosierung des benutzten Spermas bei dem Befruchtungseignis weniger ist als die Hälfte oder bevorzugterweise weniger als etwa 10% der typischen Anzahl von Spermien, die in einem typischen künstlichen Befruchtungseignis beteiligt ist. Daher ist der Ausdruck "niedrige Dosierung" im Kontext der typischen, künstlichen Befruchtungsdosierung zu sehen oder auch als eine absolute Zahl. Für Rindersperma, wo zur Zeit eine bis zehn Millionen Spermien verwendet werden, kann als ein Niedrigdosierungsprozeß angesehen werden, der eine absolute Zahl von etwa 500.000 Spermien oder vielleicht nur weniger als 300.000 Spermien oder weniger einbezieht. Tatsächlich hat durch die Benutzung der Techniken der vorliegenden Erfindung die künstliche Befruchtung mit guten Erfolgsprozentzahlen gezeigt werden können, bei Spermabefruchtungsleveln von 100.000 bzw. 250.000 Spermien (entsprechend 41% bzw.

30.08.00

DE 198 82 943 T1

- 24 -

50% Schwangerschaftsraten) wie in dem Artikel "Uterine Horn Insemination of Heifers With Very Low Numbers of Non-Frozen and Sexed Spermatozoa", wie in 48 Theriogenology 1255 (1997) publiziert wurde. Der Inhalt dieses Dokuments ist hiermit in die vorliegende Anmeldung mitaufgenommen. Weil Spermazellen anscheinend eine Empfindlichkeit bei Verdünnung zeigen, können diese Ergebnisse eine besondere wechselseitige Abhängigkeit des Gebrauchs von niedrig dosierten Spermaproben mit Bezug auf die verschiedenen Techniken der vorliegenden Erfindung zeigen. Die Absolutanzahl kann speziesabhängig sein. Für Pferdespezies können weniger als etwa 25, 10, 5 oder sogar eine Million Spermien als ein Niedrigdosierungsprozess eingeschätzt werden.

Ein weiterer Aspekt der wichtig sein kann, ist die Tatsache, daß das geschlechtsspezifische Sperma, das durch die vorliegenden Erfindungstechniken oder auf andere Art erhalten werden kann, in einem künstlichen Befruchtungssystem gebraucht wird. Daher können die Techniken der vorliegenden Erfindungen besonders relevant sein, wenn für eine Flußzytometertechnik der Sammler (14) dazu gebraucht wird, um Sperma für die künstliche Befruchtung bereitzustellen. Des weiteren ist möglich, daß die Kombination von sowohl des künstlichen Befruchtungsgebrauchs als auch des Gebrauchs in einer niedrigen Dosierungsumgebung zusammen Synergien ergeben können, welche die verschiedenen Techniken der vorliegenden Erfindung besonders geeignet machen können. Natürlich kann das geschlechtsspezifische Sperma nicht nur zur künstlichen Befruchtung, sondern auch in anderen Techniken, wie der Invitro-Befruchtung und ähnlichem eingesetzt werden.

Der Prozeß des Sammelns, der Sortierung und schließlich der Befruchtung eines Tiers durch die Benutzung der Flußzytometrie oder anderen Trennungstechniken, beinhaltet eine Vielzahl von Schritten. Im Kontext der Rinderbefruchtung wird zunächst der Samen vom Bullen durch den Gebrauch einer künstliche Vagina gesammelt. Dies tritt bei Raten von etwa 1,5 Milliarden Spermien pro Milliliter auf. Dieser reine Samen kann durch den Gebrauch eines Spektrophotometers geprüft werden, um die Konzentration zu bestimmen, und kann mikroskopisch evaluiert werden, um sicherzustellen, daß er geeigneten Beweglichkeits- und Lebensfähigkeitsstandards entspricht. Es können dann Antibiotika hinzugefügt werden. Das

Resultat kann die ursprüngliche Probe, etwa 60-70% des fortschreitend bewegungsfähigen Spermas per Ejakulat, besitzen. Zur Verarbeitung kann eine Verdünnung durch eine Art TALP (Tyrode Albumin Lactat Pyruvat) gebraucht werden, um die Anzahl der Spermien auf ein handhabbares Level (zur Flußanalyse) von etwa 100 Millionen pro Milliliter zu bringen. Das TALP nährt nicht nur die Spermazellen, sondern es kann sie auch hyperaktiviert für den Anfärbungsschritt machen. Vor der Anfärbung kann in einigen Spezies, wie den Pferdespezies, eine Zentrifugation erfolgen. Das Anfärben kann entsprechend eines Multianfärbungs- oder Einzelanfärbungsprotokolls erfolgen, das spätere ist der Gegenstand des Johnson-Patents und der damit verbundenen Technologie. Das Anfärben kann durchgeführt werden, während auch der Extender so eingestellt wird, daß eine geeignete Nährstoffumgebung erhalten wird. In Rinderanwendungen kann dies beinhalten, daß etwa 20% Eidotterinhalt in einer Zytratlösung sofort nach dem Anfärben zugegeben werden. Des weiteren ist entdeckt worden, daß es im Anfärben der Spermazellen, falls eine größere Menge des Anfärbemittels gebraucht wird, in bestimmter Weise erwartet wird, daß bessere Resultate erzielt werden können. Dieses Hochkonzentrationsanfärben kann den Gebrauch einer Menge von Anfärbemittel von mehreren 10 mikro-molaren Gehalts beinhalten, so wie unten in den Beispielen diskutiert, wo 38 mikro-molarer Inhalt des HOECHST 33342 Anfärbemittels benutzt wurde.

Nach dem Hinzufügen des Anfärbemittels kann eine Inkubationsperiode benutzt werden wie eine Inkubation eine Stunde lang bei 34°C, um die Farbstoffaufnahme mit Konzentrationen bei etwa 100 Millionen Spermazellen pro ml zu beschleunigen. Es kann dann eine Filtration durchgeführt werden, um die Beseitigung von Klumpen von Spermazellen zu erreichen und dann kann eine Verdünnung oder eine Ausweitung zur gewünschten Sortierungskonzentration von etwa 100 Millionen Spermazellen pro ml durchgeführt werden. Dann kann die Sortierung entsprechend der verschiedenen Techniken, wie vorher diskutiert, durchgeführt werden, aus welchen die Spermazellen in der Sammlungsphase gewonnen werden. Wie vorher bereits erwähnt, kann die Sammlung Proben mit etwa 2% Eidotterzytratkonzentrationsinhalt (für Rinderspezies) ergeben. Diese Probe kann dann auf etwa 3-5 Millionen Spermazellen pro ml konzentriert werden durch den Gebrauch der Zentrifugation nach welcher die Hüllflüssigkeit und die Schutzflüssigkeit entfernt werden können. Eine letzte Erweiterung kann

30.06.00

DE 198 82 943 T1

- 26 -

dann mit entweder 20%igem Eidotterzytrat oder einem Cornell Universal Extender oder ähnlichem durchgeführt werden. Der Cornell Universal Extender kann für 1000 ml die folgende Zusammensetzung haben:

14,5 g Natriumcytratdihydrat

2,1 g Na HCO<sub>3</sub>

0,4 g KCl

3,0 g Glukose

9,37 g Glyzin

0,87 g Zitronensäure

Für die 20%ige Eidotter Zusammensetzung können 800 ml der oben genannten Präparation und etwa 200 ml Eidotter gebraucht werden.

Nach dieser letzten Erweiterung können 3-5 Millionen Spermien pro ml (für Rinderspezies) erhalten werden. Diese Probe kann dann gekühlt werden um den Spermienmetabolismus zu verlangsamen und somit den Gebrauch über eine längere Zeitperiode zu gestatten. Bei den Pferdespezies kann die Probe dann in oviduktal oder anderen Befruchtungsprozessen, wie sie der Fachmann gut versteht, eingesetzt werden. Bei Rindersperma kann die Probe noch einmal auf das gewünschte Dosierungslevel verdünnt werden. Es ist entdeckt worden, daß die Verdünnung einen Effekt auf die Beweglichkeit der Spermazellen haben kann und somit kann es geeignet sein einen zu großen Level der Verdünnung zu vermeiden, indem man eine kleinere Probe nimmt.

Unbeachtet der gebrachten Trennungstechnik können zur Zeit niedrige Dosierungen von etwa 300.000 Spermien pro 0,184 ml erreicht werden. Des weiteren kann gewünscht sein, ein Level des Seminalplasmas bei etwa einem 5% Level zu halten, obwohl die Resultate dieser Bedingung zur Zeit gemischt sind. Die Spermazellenprobe kann dann in einen Halm plaziert werden, zum Gebrauch bei der künstlichen Befruchtung und kann dann zu den zu befruchtenden Kühen und Färsen gebracht werden.

Um günstig getimte künstliche Befruchtung zu erreichen, kann der Färsen- oder Kuhöstrus entsprechend bekannter Techniken synchronisiert werden, wie mit Hilfe des Gebrauchs des Prostaglandins F<sub>2α</sub> entsprechend im Fachwissen bekannter Techniken. Diese letzte Substanz kann insofern be-

30.06.00

DE 198 82 943 T1

- 27 -

sonders wertvoll sein, als berichtet wurde, daß sie potentiell eine erweiterte Fruchtbarkeit in Färsen erreichen kann, wie im Artikel "Prostaglandin F<sub>2α</sub> - a Fertility Drug in Dairy Cattle?", 18 Theriogenology 245 (1982) diskutiert ist. Der Inhalt dieses Dokuments ist hiermit in die vorliegende Anmeldung eingeschlossen. Obwohl gegenwärtige Resultate diese Prämisse nicht aufrecht erhalten haben, kann es sein, daß die vorliegende Erfindung ihre besondere Lebensfähigkeit in Situationen der geschlechtsspezifisch niedrig dosierten Befruchtung demonstriert. Für Rinderspezies kann die künstliche Befruchtung dann durch den Gebrauch von Embryotransfergerät mit der Plazierung der Spermazellen tief innerhalb des Uterushorns durchgeführt werden. Dies kann durchgeführt werden nicht im Spitzenmoment wie typischerweise in der künstlichen Befruchtung gebraucht, sondern eher in einem späteren Moment, wie etwa 12 Stunden nach der Zeit, seit der die Möglichkeit besteht, daß eine Befruchtung für geschlechtsspezifische künstliche Befruchtung kurz darauf auftreten kann. Der Gebrauch von Embryotransfergerät kann benutzt werden, weil eine hohe Empfindlichkeit der Uteruswand für solche niedrig dosierten geschlechtsspezifischen Befruchtungen gegeben sein kann.

Des weiteren können die Techniken auch zum Erreichen einer höheren Wirksamkeit kombiniert werden. Speziell sind die Prozesse, die nun erfunden worden sind und die Hochgeschwindigkeitssortierung und Niedrigdosierungsbefruchtung von geschlechtsspezifischen Embryos erlauben, auch in einem Tier mit Superovulation möglich. Die Superovulation kann durch den Gebrauch eines Pharmazeutikums zur Superovulation oder durch jegliche andere Technik erreicht werden. Das Pharmazeutikum, das die Superovulation bewirkt, dann direkt oder indirekt wirken, wie durch eine Sequenz von Reaktionen, um eine größere als die normale Produktion von Eizellen zu erhalten. Die Kombination mit der Superovulation ist überraschend, weil die Superovulation vorher so eingeschätzt wurde, daß sie eine solche Kombination behindert. Der Transport von Sperma wird bei Superovulation erschwert, so daß Tiere oft bei mehreren Gelegenheiten künstlich befruchtet wurden und/oder mit mehrfachen Dosierungen von Samen. Auch waren frühere Prozeduren der Bestimmung des Geschlechts von Samen relativ langsam; daher war es von Interesse, die Befruchtungsraten von einer einzigen Befruchtung mit einem Pharmazeutikum, das die Superovulation fördert, festzustellen, wie FSH (Follicle stimulierendes Hormon)-behandeltes



30.05.00

DE 198 82 943 T1

- 28 -

Vieh mit insgesamt nur 600.000 geschlechtsspezifischen ungefroren Spermien unter Gebrauch dieser neueren Kombination von Techniken.

Zum Beispiel wurden 12 Angus crossbred Färsen ovuliert mit Hilfe von Standardprozeduren: 6, 6, 4, 4, 2, 2, 2 und 2 mg FSH wurden intramuskulös in halbtäglichen Abständen injiziert, beginnend zwischen den Tagen 9 und 12 des Oestruszyklusses; 25 und 12,5 mg Prostaglandin F-2 alpha wurden intramuskulös injiziert zusammen mit der 6. und 7. FSH Injektion. Sperma von Bullen mit unbekannter Fruchtbarkeit wurde mit Hoechst 33342 eingefärbt und dann unter Benutzung einer MoFlo® Fluß Zytometer/Zellsortierer sortiert, welche 700 - 800 lebende Spermien von beidem Geschlecht pro Sekunde ergab. Die durchschnittliche Sortierungsreinheit war 89 % des gewünschten Geschlechts. Die sortierten Spermien wurden bis auf  $3,36 \times 10^6$  Spermien pro Milliliter aufkonzentriert, durch Zentrifugation, bei 600 g für 10 min, auf 5°C abgekühlt und vier Stunden gelagert. Dann wurden 184 µl in einer 0,25 ml Plastikhalme geladen; in jedes Uterushorn wurde die halbe Dosis davon befruchtet, 20 - 24 Stunden nach Ansetzen des Östrus unter Verwendung von automatischen Seitenöffnungs-Embryotransferscheiden. Die Embryos wurden gesammelt mit Hilfe von nichtchirurgischen Standardverfahren bei 7 oder 16 Tagen nach Östrus. Die Resultate zwischen den Tag 7 und Tag 16 Sammlungen und zwischen X- und Y-sortierten Spermien waren ähnlich. Embryos wurden von neuen Färsen gewonnen. Es gab 52 Embryos (mittel,  $4,3 \pm 5,3$ /Donor) in normalem Entwicklungsstadium, 13 retardierte Embryos und 31 unbefruchtete Eizellen. Von 46 Embryos wurde das Geschlecht bestimmt mittels PCR unter Verwendung von Primern für eine Y-Chromosom spezifische DNA Sequenz; 43 (93%) waren von dem gewünschten Geschlecht. Obwohl diese Studie nur wenige Tiere beinhaltete, hat überraschenderweise die Befruchtung von superovulierten Färsen mit einer Gesamtzahl von nur 600.000 (lebenden) geschlechtsspezifischen ungefrorenen Spermien Resultate ähnlich konventionellen Prozeduren ergeben. Variationen des oben beschriebenen können auch durchgeführt werden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf das Sortieren durch andere als flußzytometrische Mitteln, Durchführung der Superovulation in anderer Weise, die Steigerung der Fruchtbarkeit in anderer Weise und ähnliches.

Des weiteren kann die Kongruenz der Methoden von geschlechtsdeterminierten Sperma basierend auf dem DNA Inhalt, Hochgeschwindigkeitsfluß-

30.06.00

DE 198 82 943 T1

- 29 -

zytometer/Zellsortierer und Verfahren zur Befruchtung von Färsen mit weniger als einer Gesamtanzahl von 500.000 Spermien ohne die Fruchtbarkeit zu erschweren, zur Möglichkeit einer lebendigen geschlechtsspezifischen Samenindustrie in Vieh innerhalb weniger Jahre führen. Es wird eine Vielzahl von Anwendungsmöglichkeiten für geschlechtsspezifisches Sperma mit einer Genauigkeit von größer als 85% geben. Vielleicht die am meisten Naheliegende ist die Befruchtung einer Untergruppe von Vieh (sowohl Milch als auch Fleisch) für den Ersatz von weiblichen Herden und die Nutzung der gegenteiligen Untergruppe (sowohl Milch als auch Fleisch), um ganz andere Typen von Bullen zur Produktion von männlichen Exemplaren für Fleisch hervorzubringen. Eine sehr wichtige Untergruppe des oben erwähnten ist die Befruchtung von Färsen mit X-Chromosom tragenden Sperma, um weibliche Kälber zu produzieren, welche eine geringere Inzidenz von Dystozia als männliche Kälber haben, hauptsächlich bedingt durch die geringere Größe. Des weiteren würde der Nachweis von jungen Milchvatertieren sehr viel effizienter sein, mit einem Übergewicht von Färsen und Kälbern. Wenn man mehr als 85% Färsenkälber hat, macht dies es auch möglich, Milchkühe so zu führen, daß sie im Durchschnitt weniger als zwei überlebende Kälber pro Lebenszeit bilden, was zur Reduzierung von Problemen, die mit Schwangerschaft und dem Gebären assoziiert sind, führt. Einzelgeschlechtssysteme der Fleischproduktion würden auch möglich werden, in welchem jedes weibliche Tier sich selbst ersetzt und zwischen zwei und drei Jahren Alter geschlachtet wird. Auf diese Weise würde ein sehr viel höherer Prozentsatz von Nahrungsmitteln im System für das Wachstum gebraucht werden und ein geringerer Prozentsatz für die Erhaltung. Geschlechtsspezifische Samen könnten für in vitro-Befruchtung nützlich sein, und um superovulierte Kühe für den Embryotransfer zu befruchten. Oft ist ein Geschlecht von Kälbern beträchtlich wertvoller als das andere und obwohl genaue Methoden der Geschlechtsbestimmung von Embryos zur Verfügung stehen, sind sie zeitaufwendig und die Hälfte der produzierten Embryos sind vom weniger wertvollem Geschlecht. Es wird vermutet, daß genau geschlechtsspezifischer Samen in weiten Kreisen für die Befruchtung von Vieh angenommen würde, wenn die Überlastung durch die Bestimmung des Geschlechts gering wäre und die Fruchtbarkeit nur minimal beeinträchtigt würde. Der Prozentsatz an künstlich befruchteten Fleischvieh würde wahrscheinlich substantiell mit dem geschlechtsspezifischen Samen steigen.

Interessanterweise können durch die Befruchtung tief im Inneren des Uterushorns bessere Resultate erreicht werden, als durch die Befruchtung innerhalb des Uteruskörpers, wo solche Befruchtungen normalerweise stattfinden. Vielleicht ist es ebenso überraschend, daß die bis jetzt studierten Proben keine Differenz zwischen ipsi- und kontralateralen Befruchtungen gezeigt haben, wenn sie tief im Inneren des Uterushorns durchgeführt wurden. Unter tief soll verstanden werden, daß die Einführung gut in das Uterushorn plaziert wird unter Gebrauch von Embyotransfergeräts. Die Tatsache, daß die Resultate beim Gebrauch von ipsi- und kontralateraler Befruchtung nicht signifikant unterschiedlich erscheinen, hat die vorliegenden Erfinder dazu geführt, den Gebrauch der Befruchtung in beiden vorzuschlagen, so daß der Prozeß der Identifikation des geeigneten Uterushorns nicht länger benötigt wird.

Als Resultat der Befruchtung ist es natürlich auch erwünscht, daß ein Tier des gewünschten Geschlechts produziert wird. Dieses Tier kann entsprechend der früher diskutierten Systeme durch den Gebrauch von geschlechtsspezifischen Spermaproben produziert werden. Es sollte auch verstanden werden, daß die Techniken der vorliegenden Erfindung auch Anwendung in anderen Techniken finden können, wie der laproskopischen Befruchtung, der ovuduktalen Befruchtung oder ähnlichen.

Als Beispiele sind die folgenden Experimente durchgeführt worden. Obwohl nicht alle immer jeden Aspekt der hier beschriebenen Erfindung gebrauchen, zeigen sie doch die Leistungssteigerungen, die durch die verschiedenen Aspekte der Erfindung möglich sind. Des weiteren ist eine Zusammenfassung einiger Experimente in dem Artikel "Uterine Horn Insemination of Heifers With Very Low Numbers of Non-frozen and Sexed Spermatozoa" enthalten, auf den vorher verwiesen wurde. Dieser Artikel faßt einige der Daten zusammen, die die Effizienz der vorliegenden Erfindung zeigen. Von den Experimenten ist eines mit den geschlechtsspezifischen ungefrorenen Spermazellen mit hohem Erfolg wie folgt durchgeführt worden:

#### Beispiel 1

Angusfärsen, im Alter von 13 bis 14 Monaten und mit mittelmäßiger körperlicher Konstitution wurden mit 25 mg Prostaglandin F-2 alpha in Inter-

vallen von 12 Tagen synchronisiert und 6 bis 26 Stunden nach der beobachteten Standöstrus befruchtet. Frisch gesammelte Samen von drei 14 bis 16 Monate alten Bullen wurde in  $38 \mu\text{mol}$  Hoechst 33342 inkubiert bei  $75 \times 10^6$  Spermien pro ml in einem TALP Medium für eine Stunde bei  $34^\circ\text{C}$ . Sperma wurde sortiert durch Geschlechtschromosomen auf der Basis von Epifluoreszenz bei der Laseranregung bei 351 und 364 nm bei 150 mW unter Gebrauch eines MoFlo® Flußzytometer/Zellsortierers, der bei 50 psi betrieben wurde und unter Gebrauch von 2,9 % Natriumzitrat als Hüllflüssigkeit. X chromosomtragendes Sperma (rund 90% Reinheit wie bestätigt durch Resortierung von sonikatierten Spermaaliquoten) wurden bei rund 500 lebenden Spermien pro Sekunde gesammelt in 2 ml Eppendorf Röhren, die 100  $\mu\text{l}$  Cornell Universal Extender (CUE) mit 20% Eidotter enthielten. Das gesammelte Sperma wurde zentrifugiert bei  $600 \times g$  für 10 Minuten und resuspendiert zu  $1,63 \times 10^6$  lebenden Spermien pro ml in CUE. Für eine Flüssigsamen nicht geschlechtsspezifische Kontrolle wurden Hoechst 33342 angefärbte Spermien mit Hüllflüssigkeit zu  $9 \times 10^5$  Spermien pro ml verdünnt und zentrifugiert und resuspendiert zu  $1,36 \times 10^6$  progressiv beweglichen Spermien pro ml in CUE. Geschlechtsspezifische Samen und flüssige Kontrollsammen wurden auf  $5^\circ\text{C}$  über 75 min abgekühlt und in 0,25 ml Halme geladen (184  $\mu\text{l}$  pro Halm). Die Halme wurden bei 3 bis  $5^\circ$  in einem temperaturkontrollierten Getränkeköhler 240 km für Befruchtungen nach 5 bis 9 Stunden nach der Sortierung gebracht. Geschlechtsspezifische Samen und flüssiger Kontrollsammen wurden befruchtet unter Benutzung von seitenöffnungsblauen Scheiden, (IMV), eine Hälfte von dem jeweiligen Halm in jedes Uterushorn ( $3 \times 10^5$  lebende Spermien/pro Färse). Als Standardkontrolle wurde Samen von den selben Bullen eingefroren in 0,5 cc Halme mittels Standardprozeduren (mittlere  $15,6 \times 10^6$  bewegliche Spermien/Dosierung nach dem Auftauen) aufgetaut bis auf  $35^\circ\text{C}$  in 30 Sekunden und befruchtet in den Uteruskörper. Die Behandlungen wurden ausgeglichen über die drei Bullen und zwei Befruchtungen in einem Verhältnis von 3:2:2 für die Befruchtungen mit dem geschlechtsspezifischen Samen und die zwei Kontrollen. Schwangerschaft wurde mittels Ultraschall 31 bis 34 Tage nach der Befruchtung festgestellt und 64 bis 67 Tage später bestätigt, wobei auch das Geschlecht der Föten bestimmt wurde (blind). Daten sind in der Tabelle aufgeführt.

Behandlung	Anzahl an her-	Anzahl Schwan-	Anzahl Schwan-	Keine weiblichen
------------	----------------	----------------	----------------	------------------

30.05.00

DE 198 82 943 T1

- 32 -

	vorgebrachten Färsen	ger-Tage 31 - 34	ger-Tage 64 - 67	Föten
Geschlechtsspezifischer Samen	45	20 (44%)	19 (42%)	18 (95%) <sup>a</sup>
Flüssige Kontrolle	28	15 (54 %)	15 (54%)	8 (53%) <sup>b</sup>
Gefrorene Kontrolle	29	16 (55 %)	15 (52%)	12 (80%) <sup>c</sup>

<sup>a, b</sup> Geschlechtsverhältnis von Werten mit unterschiedlichen hochgestellten Buchstaben unterscheiden sich ( $P < 0,02$ )

Obwohl die Schwangerschaftsrate mit dem geschlechtsspezifischen Samen nur 80% der Kontrollversuche betrug, war diese Differenz nicht statistisch signifikant ( $>0,1$ ). Eine Schwangerschaft wurde verloren nach 64 - 67 Tagen sowohl in der geschlechtsspezifischen als auch der gefrorenen Kontrollgruppe. 18 der 19 Föten (95%) waren weiblichen in der geschlechtsspezifischen Gruppe und 20 von 30 (67%) waren weiblich in den Kontrollgruppen. Die flüssige Samenkontrolle ergab eine nahezu identische Schwangerschaftsrate im Vergleich zu der gefrorenen Samenkontrolle, die über 50 mal mehr bewegliche Spermien enthielt (über 120 mal mehr Gesamtsperma), somit ist die Wirksamkeit der niedrigdosierten Befruchtung in das Uterushorn demonstriert. Wir haben das Geschlechtsverhältnis in Vieh signifikant geändert unter Verwendung von Flußzytometer-Technologie und künstlicher Befruchtung.

In ähnlicher Weise wurde ein Experiment mit nicht geschlechtsspezifischen ungefrorenen Spermazellen durchgeführt und kann folgenderweise berichtet werden:

#### Beispiel 2

Die Absicht war, die Schwangerschaftsraten zu bestimmen, wenn Färsen mit extrem kleinen Zahlen an gefrorenem Sperma unter idealen Feldbedingungen befruchtet werden. Samen von drei Holstein Bullen von der oben erwähnten durchschnittlichen Fruchtbarkeit wurde in homogenisierter Milch erweitert, 7% Glyzerin (CSS) Extender plus 5% homologes Seminalplasma zu  $2 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$  oder  $10 \times 10^6$  (Kontrolle) Gesamtspermien pro 0.25 ml French Halm und gefroren in beweglichem flüssigen Stickstoff-

30.05.00

- 33 -

DE 198 82 943 T1

dampf. Samen wurde aufgetaut in 37°C warmen Wasser für 20 Sekunden. Holstein Färsen im Alter von 13 bis 15 Monaten, welche 350 bis 450 kg wogen, wurde 25 mg Prostaglandin F2-alpha (Lutalyse®) zweimal in einem Zwölftage-Intervall injiziert und befruchtet mit einem Embryotransferhalm-Gewehr und Seitenöffnungsscheide, die Hälfte des Samens tief in jedes Uterushorn 12 oder 24 Stunden nach der Detektion des Östrus. Das Experiment wurde innerhalb von 5 Monaten fünfmal wiederholt und ausgeglichen über zwei Befruchtungstechniker. Die Umgebungstemperatur während der Züchtung war oft -10 bis -20°C, so daß darauf aufgepaßt wurde, daß das Befruchtungsequipment warmgehalten wurde. Die Schwangerschaft wurde festgestellt durch die Detektion von einem beweglichen Fötus unter Verwendung von Ultraschall 40 bis 44 Tage nach Östrus und 55 bis 62 Tage nach Östrus bestätigt; vier von 202 Empfungen wurden verloren zwischen diesen Zeiten. Tag 55 bis 62 Schwangerschaftsraten waren 55/103 (53%), 71/101 (70%) und 72/102 (71%) für,  $2 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$  und  $10 \times 10^6$  Gesamtsperma/Befruchtungen ( $P < 0,1$ ). Schwangerschaftsraten waren unterschiedlich ( $P < 0,05$ ) zwischen Bullen (59, 62 und 74%), aber nicht zwischen Technikern (64 und 65%) oder der nach Östrus Befruchtungszeiten (65% für 12 Stunden und 64% für 24 Stunden, N-153 zu jeder Zeit). Mit den Beschriebenen Methoden waren die Schwangerschaftsraten in Färsen mit  $5 \times 10^5$  und  $10 \times 10^6$  Gesamtsperma pro Befruchtungsprobe ähnlich.

Ein Experiment ist auch durchgeführt worden mit geschlechtsspezifischen ungeborenen Spermazellen und kann wie folgt berichtet werden:

### Beispiel 3

Samen wurde von Bullen bei der Atlantic Breeders Cooperativ gesammelt, verdünnt 1:4 mit einem HEPES-gepufferten Extender + 0,1 % BSA und 160 km (rund 2 HR) nach Beltsville, Maryland, transportiert, wo es bei Raumtemperatur mit Hilfe von Flußzytometrie in eine TEST-Ausbeute (20%) Extender sortiert wurde, bei Verwendung von Methoden wie vorher beschrieben (Biol. Reprod. 41:199). Sortieraten von bis zu  $2 \times 10^6$  Spermien von jedem Geschlecht pro 5 bis 6 Stunden bei einer Reinheit von etwas 90% wurden erreicht. Sperma wurde mittels Zentrifugation (300 gr für 4 min) konzentriert auf  $2 \times 10^6$  Spermien pro ml. Einige Spermien wurden im Extender sortiert, das homologes Seminalplasma (Endkonzentration, 5%) enthielt. Sortiertes Sperma wurde mit dem Flugzeug nach Colorado (rund

30.05.00

- 34 - DE 198 82 943-T1

2600 km) verschickt und entweder bei Raumtemperatur oder bei 5°C gelagert (während der Versendung über 6 Stunden in einem Equitainer gekühlt, ein isoliertes Gerät mit einem eishaltigen Kompartiment).

Färsen oder trockene Kühe in welchen der Östros 12 oder 36 Stunden vorher festgestellt worden war, wurden innerhalb von 9 - 29 Stunden nach dem Ende der Spermasortierungssession befruchtet. Sperma ( $1 \text{ zu } 2 \times 10^5$  in 0,1 ml) wurde tief in das Uterushorn ipsilateral zum Eierstock mit dem grössten Follikel, wie mittels Ultraschall bestimmt, zur Zeit der Befruchtung deponiert.

Keines der 10 weiblichen Tiere wurde schwanger als sie mit Sperma befruchtet wurde, das bei Raumtemperatur verschickt und gelagert wurde. Von 29 weiblichen Tieren, die mit Sperma, das während des Verschickens auf 5 Grad abgekühlt wurde, waren noch 14 nach 4 Wochen schwanger und 12 (41%) nach 8 Wochen. 11 der 22, die innerhalb von 10 Stunden nach dem Ende des Sortierungsprozesses befruchtet wurden, wurden nach 8 Wochen schwanger aber nur eine von 7, die 17-24 Stunden nach dem Sortiervorgang befruchtet wurden, war schwanger. Es gab keinen signifikanten Effekt der Hinzufügung vom seminalem Plasma. Einer der 12 Föten war nicht von dem vorausbestimmten Geschlecht einer war unklar, und 10 waren von dem vorausbestimmten Geschlecht, wie bestimmt mittels Ultrasonographie nach 60-70 Tagen der Schwangerschaft. In der Folge wurden 33 zusätzliche Färsen mit 0,05 ml (Samen verlängert wie oben beschrieben) in jedes Uterushorn ohne den Gebrauch von Ultrasonographie befruchtet; nur 3 wurden 4 Wochen nach der Befruchtung schwanger und nur eine blieb nach 8 Wochen schwanger. Es wurden jedoch verschiedene Bullen von den vorangegangenen Gruppen benutzt und alle Befruchtungen wurden 18-29 Stunden nach dem Sortiervorgang durchgeführt. Weitere 38 Färsen wurden in 200 km Entfernung von unserem Labor mit sortiertem Sperma von einem anderen Bullen in gleicher Weise befruchtet (rund 22 Stunden nach dem Sortiervorgang); keine von diesen war nach 8 Wochen nach der Befruchtung schwanger.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es möglich ist, Schwangerschaften in Vieh mittels künstlicher Befruchtung von Sperma, das nach den Geschlechtschromosomen mittels Flusszytometrie sortiert wurde, zu erreichen und das Geschlechtsverhältnis von Föten approximiert dasjenige, das

durch eine Re-analyse der sortierten Spermien für ihren DNA-Kontent (90%) vorhergesagt wurde. Jedoch variierten die Schwangerschaftsraten stark in diesen vorläufigen Experimenten, welche eine Verschickung des Spermas über weitere Distanzen erforderte. Die Fruchtbarkeit fiel drastisch durch einen Nach-Sortierungsprozeß von 17 Stunden, es gab jedoch einige Unordnung weil verschiedene Bullen zu verschiedenen Zeiten benutzt wurden. Weitere Studien werden benötigt, um zu bestimmen, ob die beobachteten Variationen der Schwangerschaftsraten durch Bullendifferenzen, Befruchtungstechniken im Interval zwischen Sortierung und Befruchtung oder anderen Faktoren bestimmt werden.

Schliesslich wurde auch ein Experiment durchgeführt mit geschlechtsunspezifischen, ungefrorenen Spermazellen, welches wie folgt wiedergegeben werden kann:

#### Beispiel 4:

Das Ziel war die Bestimmung von Schwangerschaftsraten bei Befruchtung der Färsen mit der geringen Anzahl von Spermien unter idealen experimentellen Bedingungen. Sperma von drei Holsteinbullen wurde verlängert in Cornell Universal Extender plus 5% homologem Seminalplasma zu  $1 \times 10^5$  oder  $2,5 \times 10^5$  Spermien pro 0,1 ml;  $2,5 \times 10^6$  Gesamtsperma pro 0,25 ml wurde zur Kontrolle gebraucht. Voll-verlängerter Samen wurde in modifizierte 0,25 ml plastic French Halme gepackt um die 0,1 oder 0,25 ml Befruchtungsdosen zu liefern. Der Samen wurde auf 5 Grad abgekühlt und 26-57 Stunden nach der Sammlung benutzt. Holsteinfärsen im Alter von 12-15 Monaten bei einem Gewicht von 350-450 kg wurde 25 mg Prostaglandin F2 alpha (Lutalyse \*) in 12 Tagen-Intervallen injiziert und 24 h nach Detektion des Östrus mit einem Befruchtungrohr und Seitenöffnungsscheide in ein Uterushorn befruchtet. Die Befruchtung war ipsilateral zu der Seite mit dem grössten Follikel, das 12 Stunden nach Östros mit Ultraschall bestimmt wurde, die Seite der Ovulation wurde durch die Bestimmung eines Corpus Luteum mittels Ultraschall 7-9 Tage Post Östrus verifiziert. Die Schwangerschaft wurde durch die Bestimmung eines Fötus durch Ultraschall 42-45 Tage post estros festgestellt. Das Experiment wurde viermal wiederholt und über 3 Befruchtungstechniker ausgeglichen. Die Ovulationsseite wurde in 205 von 225 Färsen korrekt bestimmt (91%). Erstaunlicherweise waren die Schwangerschaftsraten für ipsilaterale und kontralate-



rale Befruchtungen fast identisch. Die Schwangerschaftsraten waren 38/93 (41%) 45/87 (52%), und 25/45 (56%) für  $1 \times 10^5$ ,  $2,5 \times 10^5$  und  $2,5 \times 10^6$  Spermien/Befruchtungsprobe ( $p > 0,1$ ). Es gab eine signifikante Differenz in der Schwangerschaftsrate ( $p > 0,05$ ) unter den Technikern aber nicht unter den Bullen. Mit den beschriebenen Methoden kann es möglich sein, die Anzahl von Spermien pro Befruchtungsprobe in ausreichender Weise zu reduzieren, so dass nach dem Geschlecht sortiertes Sperma mit einem Schusszytometer kommerziell verwendet werden könnte.

Wie erwähnt und wie die verschiedenen Experimenten zeigen, ist das Gebiet statistisch basiert und daher kann eine Vielzahl von weiteren Experimenten durchgeführt werden um die geeignete Kombinationen und Eingrenzungsstrategien zu zeigen. Daher werden Synergien zwischen verschiedenen Effekten weiter identifiziert werden, wie z.B. Umstände in welchen die Farbstoffeffekte und kombinierten Farbstoffeffekte mit der Laseranregung studiert werden können. Die Diskussion in dieser Anmeldung soll als eine grundlegende Beschreibung dienen. Der Leser sollte sich der Tatsache bewusst sein, dass die spezifische Diskussion nicht explizit alle möglichen Ausführungsformen beschreiben mag; viele Alternativen sind implizit. Sie vermag nicht die generische Natur der Erfindung vollständig zu beschreiben und vermag nicht explizit zeigen, wie jedes Merkmal oder Element tatsächlich repräsentativ für eine breitere Funktion oder für eine grosse Anzahl von Alternativen oder äquivalenten Elementen sein kann. Es sei nochmals gesagt, dass diese implizit in dieser Offenbarung enthalten sind. Wo die Erfindung in einer geräteorientierten Terminologie beschrieben ist, meistert jedes Element des Geräts implizit eine Funktion. Vorrichtungsansprüche können nicht nur für die beschriebenen Geräte eingeschlossen sein sondern auch Methoden oder Verfahrensansprüche können eingeschlossen sein, um die Funktionen der Erfindung und die Leistung jeglichen Elements anzusprechen. Weder die Beschreibung noch die Terminologie soll den Umfang der Ansprüche, welche eingereicht werden können, limitieren. Es sollte verstanden werden, dass eine Vielzahl von Änderungen gemacht werden können, ohne von der Essenz der Erfindung wegzugehen. Solche Änderungen sind auch implizit in der Beschreibung eingeschlossen. Sie fallen auch noch in den Bereich dieser Erfindung. Eine breite Offenbarung, die sowohl die expliziten Ausführungsformen, wie gezeigt, als auch die grosse Vielzahl von impliziten alternativen Ausführungsformen und die

breiten Methoden oder Prozesse oder ähnliches umfasst, sind von dieser Offenbarung umfasst.

Zusätzlich kann jedes der verschiedenen Elemente der Erfindung und der Ansprüche auch auf vielerlei Weise erreicht werden. Diese Offenbarung sollte so verstanden werden, dass sie jegliche dieser Variationen umfasst, sei es eine Variation einer Ausführungsform, einer Vorrichtungsausführung, einer Methode oder Verfahrensausführung oder nur eine Variation irgendeines der Elemente davon. Besonders sollte verstanden werden, dass, weil die Offenbarung mit den Elementen der Erfindung verbunden ist, die Wörter für jedes Element durch äquivalente Vorrichtungsbegriffe oder Methodenbegriffe ausgedrückt werden können - sogar wenn nur die Funktion oder das Ergebnis dasselbe ist. Solche äquivalenten, breiteren oder sogar generischeren Ausdrücke sollten in der Beschreibung von jedem Element oder Handlung fest miteinbezogen werden. Solche Ausdrücke können - wo erwünscht - ersetzt werden, um die implizite breite Abdeckung, für welche diese Erfindung vorgesehen ist explizit zu machen. Es sollte nur als ein Beispiel verstanden werden, dass alle Handlungen als ein Mittel zur Durchführung dieser Handlung ausgedrückt werden können oder als ein Element, welches diese Handlung bewirkt. Ähnlich sollte jedes offenbarte physikalische Element so verstanden werden, als auch die Offenbarung der Handlung mitumfasst ist, welche das physikalische Element erleichtert. Nur ein Beispiel dieses Aspekts, die Offenbarung eines "Sammlers" soll so verstanden werden, auch die Offenbarung des Aktes der "Sammlung" - ob explizit diskutiert oder nicht - zu umfassen - und so nur der Akt des "Sammelns" offenbart ist soll die Offenbarung auch so verstanden werden, dass auch die Offenbarung eines "Sammlers" umfasst ist. Solche Änderungen und alternativen Begriffe sollen so verstanden werden, dass sie explizit in dieser Beschreibung eingeschlossen sind. Desweiteren sollte auch verstanden werden, dass zusätzlich zu den ursprünglich präsentierten Ansprüchen die Ansprüche variiert werden können, um noch expansiver ansprechen zu können zumindest I) Geräte wie hier offenbart und beschrieben, II) die verbundenen Methoden, offenbart und beschrieben, III) gleiche äquivalente und sogar implizierte Variationen von jeder dieser Geräte und Methoden, IV) diese alternativen Designs, welche jede der Funktionen zeigen wie offenbart und beschreiben, V.) diese alternativen Designs und Methoden, welche der gezeigten Funktionen wie sie implizit sind zu

30.05.00

- 38 -

DE 198 82 943 T1

erreichen, um das was offenbart und beschreiben ist zu erreichen, VI) jedes Merkmal, Komponente und Schritt, das als separate und unabhängige Erfindung gezeigt ist und VII) die vielfältigen Kombinationen und Permutationen von jeglichem oben gesagtem. Um dem Verständnis der Erfindung zu helfen können eine Reihe von publizierten Referenzen nützlich sein. Diese werden im folgenden aufgelistet und der Inhalt der Dokumente ist hiermit in folgender Anmeldung eingeschlossen; jedoch soweit Aussagen in Betracht kommen, die nicht konsistent mit Patentierung dieser Erfindung (EN) sind, sind solche Aussagen ausdrücklich nicht als von den Anmeldern gemacht anzusehen. Potentiell nützliche Referenzen schliessen ein: 5660997; 5589457; 5514537; 5439362; 5346990; 5135759; 5021244; 4999283; 4749458; 4698142; 4680258; 4511661; 4448767; 4362246; 4339434; 4276139; 4225405; 4191749; 4155831; 4092229; 4085205; 4083957; 4067965; 4009260; 3894529; 3687806; RE32350. Nützliche Referenzen können ebenfalls die folgenden Publikationen einschliessen: "Insemination of Holstein Heifers with very low numbers of unfrozen Spermatozoa". G.E. Seidel, Jr., C.H. Allen, Z. Brink, J.K. Graham, und M.B. Cattell, Colorado State University, Fort Collins, Atlantic Breeders Cooperative, Lancaster, PA., DUO Dairy, Loveland, CO. Juli 1995; "Artificial Insemination with X- and Y-Bearing Bovine Sperm", G.E. Seidel, Jr., L.A. Johnson, C.A. Allen, G.R. Welch, M.D. Holland, Z. Brink and M.B. Cattell, Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, Colorado State University, Fort Collins, CO; Germplasm and Gamete Physiology Lab, ARS, USDA, Beltsville, MD; Atlantic Breeders Coop, Lancaster PA; DUO Dairy, Loveland, CO, USA Januar 1996; "Insemination of Heifers with Very Low Numbers of Frozen Spermatozoa." G. E. Seiderl, Jr., C.H. Allen, Z. Brink, M.D. Holland, and M.B. Cattell, Colorado State University, Fort Collins, Atlantic Breeders Cooperative, Lancaster, PA, DUO Dairy, Loveland, CO, July 1996; "Production of Lambs by Low Dose Intrauterine Insemination With Flow Cytometrically Sorted and Unsorted Semen," D.G. Cran, W.A.C. McKelvey, M.E. King, D.F. Dolman, T.G. McEvoy, P.J. Broadbent and J.J. Robinson, Mastercalf, Craibstone, Bucksburn, Aberdeen, AB21 9TN, UK Scottish Agricultural College, Craibstone, Bucksburn, Aberdeen. AB21 9YA, UK, Theriogenology, Page 267; "Uterine Horn Insemination of Heifers With Very Low Numbers of Nonfrozen and Sexed Spermatozoa," G.E. Seidel, Jr., C.H. Allen, L.A. Johson, M.D. Holland, Z.Brink, G.R. Welch, J.K. Graham and M.B. Cattell, Animal Reproduction

30.05.00

- 39 -

DE 198 82 943 T1

and Biotechnology Laboratory Colorado State University, Atlantic Breeders Cooperative, Lancaster, PA 17601, Germplasm and Gamete Physiology Laboratory ARS, USDA, Beltsville, MD 20705, DUO Dairy, Loveland, CO 80538, Theriogenology 48: 1255-1264, 1997; "Capacitation of Bovine Sperm by Heparin," J.J. Parrish, J. Susko-Parrish, M.A. Winer, and N.L. First, Department of Meat and Animal Science, University of Wisconsin, Madison, WI 53706, Biology of Reproduction 38, 1171-1180 (1988); "Prostaglandin F2a - A Fertility Drug in Dairy Cattle?", K.L. Macmillan and A.M. Day, Ruakura Animal Research Station, Private Bag, Hamilton, New Zealand, Theriogenology, September 1982, VOL. 18 No. 3, pages 245-253; "Prospects for Sexing Mammalian Sperm", Colorado Associated University Press, Animal Reproduction Laboratory College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Colorado State University, Fort Collins, CO, 80523 Edited by Rupert P. Amann and George E. Seidel, Jr., 1982; "Effects of Egg Yolk-Citrate and Milk Extenders on Chromatin Structure and Viability of Cryopreserved Bull Sperm", J Dairy Sci 74:3836, D.S. Karabinus and D.P. Evenson and M.T. Kaproth; "Assessment of Ram and Boar Spermatozoa during Cell-sorting by Flow Cytometry", Reprod. Dom Anim 32:251; "Superovulation of Goats with Purified pFSH Supplemented with Defined Amounts of pLH", Therio. 43:797, M.A. Nowshari, J.F. Beckers, and W. Holtz; "Gender Preselection in Mammals: An Overview", Dtsch. tierärztl. Wschr. 103:285, L.A. Johson.

Innerhalb dieser Beschreibung, ausgenommen dass der Kontext es anders verlangt, wird das Wort "umfassend" oder Variationen desselben wie "umfasst" oder "umfassend", verstanden werden als solches, welches den Einschluss eines Elements oder Integers oder Gruppe von Elementen oder Integers impliziert aber nicht den Ausschluss von jeglichen anderen Elementen oder Integer oder Gruppen von Elementen oder Integers.

**Patentansprüche**

1. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmten Geschlecht, das die Schritte:
  - a) Sammeln von Spermazellen einer männlichen Spezies des Säugetiers;
  - b) Bestimmung der Geschlechtscharakteristik einer Vielzahl dieser Spermazellen;
  - c) Sortieren dieser Spermazellen entsprechend der Bestimmung ihrer Geschlechtscharakteristik;
  - d) Herstellen einer Befruchtungsprobe, die eine geringe Anzahl dieser Spermazellen im Vergleich zu der Dosierung bei der typischen künstlichen Befruchtung enthält;
  - e) Einführung von zumindest eines Teils dieser Befruchtungsprobe in eine weibliche Spezies dieses Säugetiers;
  - f) Befruchtung von zumindest einem Ei innerhalb der weiblichen Spezies des Säugetiers mit Erfolgsleveln, die statistisch mit denjenigen vergleichbar sind, die mit der Dosierung bei der typischen geschlechtsunspezifischen künstlichen Befruchtung erreicht werden; und
  - g) Herstellen eines Säugetierabkömmlings des gewünschten Geschlechts.
2. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmtem Geschlecht gemäß Anspruch 1, wobei der Schritt der Befruchtung von zumindest einem Ei innerhalb der weiblichen Spezies des Säugetiers mit Erfolgsleveln, die statistisch mit denjenigen vergleichbar sind, die mit der Dosierung bei einer typischen künstlichen Befruchtung erreicht werden, den Schritt der Befruchtung von zumindest einem Ei innerhalb der weiblichen Spezies des Säugetiers bei einem Erfolgslevel ausgewählt aus der Gruppe von zumindest 35 %, zumindest 41%, zumindest 50% und zumindest 90% umfaßt.
3. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit einem vorherbestimmten Geschlecht gemäß Anspruch 2, wobei der Schritt des Sammelns von Spermazel-

len von einer männlichen Spezies des Säugetiers den Schritt des Sammelns von Spermazellen von einem männlichen Spezies des Säugetiers ausgewählt aus der Gruppe von Rindern und Pferden umfaßt.

4. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmten Geschlecht gemäß Anspruch 1, wobei der Schritt des Herstellens einer Befruchtungsprobe, die eine geringe Anzahl der Spermazellen im Vergleich zu der Dosierung bei der typischen künstlichen Befruchtung enthält, den Schritt des Herstellens einer Befruchtungsprobe, die nicht mehr als 10% der typischen Anzahl von Spermien, wie sie in einem typischen geschlechtsunspezifischen künstlichen Befruchtungsvorgang verwendet werden, umfaßt.
5. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmten Geschlecht gemäß Anspruch 3, wobei der Schritt des Herstellens einer Befruchtungsprobe, die eine geringe Anzahl der Spermazellen im Vergleich zu der Dosierung bei einer typischen künstlichen Befruchtung enthält, den Schritt des Herstellens einer Befruchtungsprobe ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus: einer Rinderbefruchtungsprobe von nicht mehr als 100.000 Spermazellen, einer Rinderbefruchtungsprobe von nicht mehr als 250.000 Spermazellen, einer Rinderbefruchtungsprobe von nicht mehr als 300.000 Spermazellen, einer Pferdebefruchtungsprobe von nicht mehr als 1.000.000 Spermazellen, einer Pferdebefruchtungsprobe von nicht mehr als 5.000.000 Spermazellen, einer Pferdebefruchtungsprobe von nicht mehr als 10.000.000 und einer Pferdebefruchtungsprobe von nicht mehr als 25.000.000 Spermazellen, umfaßt.
6. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmten Geschlecht gemäß einem der Ansprüche 1, 2, 3, 4 oder 5, wobei die Schritte der Einführung von zumindest einem Teil der Befruchtungsprobe in eine weibliche Spezies dieses Säugetiers und der Befruchtung von zumindest einem Ei innerhalb der weiblichen Spezies des Säugetiers bei Erfolgsleveln, die statistisch mit denjenigen vergleichbar sind, die mit der Dosierung bei der typischen geschlechtsunspezifischen künstlichen Befruchtung erreicht werden, alle in einer Feldumgebung durchgeführt werden.
7. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmtem Geschlecht gemäß Anspruch 6, wobei die Schritte der Einführung von zumindest einem Teil der Befruchtungsprobe in eine weibliche Spezies des Säugetiers und der Befruchtung von zumindest einem Ei innerhalb der weiblichen Spezies des

Säugetiers mit Erfolgsleveln, die statistisch mit denjenigen vergleichbar sind, die mit der Dosierung bei der typischen geschlechtsunspezifischen künstlichen Befruchtung erreicht werden in einer Feldumgebung die Schritte des wiederholten Einführens einer signifikanten Anzahl von Befruchtungsproben in eine signifikante Anzahl der weiblichen Spezies des Säugetieres in schneller Abfolge und unter Bedingungen wie sie auf einer Farm oder Ranch herrschen, umfassen.

8. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmtem Geschlecht gemäß Anspruch 1, 2, 3, 4 oder 5, worin das Säugetier Uterushörner besitzt und wobei der Schritt der Einführung von zumindest eines Teils der Befruchtungsprobe in eine weibliche Spezies des Säugetiers den Schritt der Einführung der Befruchtungsprobe sowohl ipsi- als auch kontralateral innerhalb der Uterushörner des Säugetiers umfaßt.
9. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmtem Geschlecht gemäß Anspruch 1, 2, 3, 4 oder 5, worin das Säugetier zumindest ein Uterushorn besitzt und worin der Schritt der Einführung von zumindest eines Teils der Befruchtungsprobe in eine weibliche Spezies des Säugetiers den Schritt der Einführung der Befruchtungsprobe tief innerhalb des Uterushorns umfaßt.
10. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmtem Geschlecht gemäß Anspruch 8, wobei der Schritt der Einführung von mindestens einem Teil der Befruchtungsprobe in eine weibliche Spezies weiter den Schritt der Einführung der Befruchtungsprobe tief innerhalb des Uterushorns umfaßt.
11. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmtem Geschlecht gemäß Anspruch 9, wobei der Schritt der Einführung von zumindest eines Teils der Befruchtungsprobe in eine weibliche Spezies des Säugetiers weiter den Schritt der Einführung der Befruchtungsprobe innerhalb des Uterushorns durch den Gebrauch von Embryotransfergerät umfaßt.
12. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmtem Geschlecht gemäß Anspruch 10, wobei der Schritt der Einführung von zumindest eines Teils der Befruchtungsprobe in eine weibliche Spezies des

Säugetiers weiter den Schritt der Einführung der Befruchtungsprobe innerhalb des Uterushorns durch den Gebrauch von Embryotransfergerät umfaßt.

13. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmtem Geschlecht gemäß Anspruch 8, wobei der Schritt der Einführung von zumindest eines Teils der Befruchtungsprobe in eine weibliche Spezies des Säugetiers den Schritt der Einführung der Befruchtungsprobe 12 Stunden nach der Zeit, welche im allgemeinen als optimal für eine einzelne künstliche Befruchtung erachtet wird, umfaßt.
14. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmtem Geschlecht gemäß Anspruch 12, wobei der Schritt des Herstellens einer Befruchtungsprobe, die eine geringe Anzahl der Spermazellen im Vergleich zu der Dosierung bei der typischen künstlichen Befruchtung enthält, den Schritt des Herstellens einer ungefrorenen Befruchtungsprobe umfaßt, wobei der Schritt des Sortierens der Spermazellen entsprechend der Bestimmung ihrer Geschlechtscharakteristik bei einem Sortierungszeitpunkt auftritt und wobei der Schritt der Einführung von zumindest eines Teils der Befruchtungsprobe in eine weibliche Spezies des Säugetiers nicht später als etwa 17 Stunden vom Sortierungszeitpunkt an erfolgt.
15. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmtem Geschlecht gemäß Anspruch 12, wobei der Schritt des Herstellens einer Befruchtungsprobe, die eine geringe Anzahl der Spermazellen im Vergleich zu der Dosierung bei der typischen künstlichen Befruchtung enthält, den Schritt des Herstellens einer ungefrorenen Befruchtungsprobe umfaßt, worin der Schritt des Sortierens der Spermazellen entsprechend der Bestimmung ihrer Geschlechtscharakteristik zu einem Sortierungszeitpunkt erfolgt und wobei der Schritt der Einführung von zumindest eines Teils der Befruchtungsprobe in eine weibliche Spezies des Säugetieres nicht später als 10 Stunden nach dem Sortierungszeitpunkt erfolgt.
16. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmtem Geschlecht gemäß Anspruch 6, worin der Schritt der Bestimmung der Geschlechtscharakteristik einer Vielzahl der Spermazellen den Schritt des Anfärbens der Zellen mit einer hohen Konzentration an Anfärbemittel umfaßt.



17. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmtem Geschlecht gemäß Anspruch 6, wobei der Schritt der Bestimmung der Geschlechtscharakteristik einer Vielzahl der Spermazellen den Schritt der Anfärbung dieser Zellen mit zumindest ungefähr 38 mikromolarem Inhalt des Anfärbemittels umfaßt.
18. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmtem Geschlecht gemäß Anspruch 1, worin die Schritte der Bestimmung der Geschlechtscharakteristik einer Vielzahl der Spermazellen und des Sortierens dieser Spermazellen entsprechend der Bestimmung ihrer Geschlechtscharakteristik die Schritte:
  - a. Herstellen einer Zellquelle, welche die zu sortierenden Zellen liefert,
  - b. chemische Abstimmung einer Hüllflüssigkeit, um eine Hüllflüssigkeitsumgebung für die Zellen herzustellen, welche sowohl mit einer Vorsortierungs- als auch Nachsortierungsflüssigkeitsumgebung abgestimmt ist;
  - c. Bestimmung einer Eigenschaft der Zellen;
  - d. Unterscheiden zwischen Zellen mit einer gewünschten Geschlechtscharakteristik;
  - e. Sammeln der Zellen mit der gewünschten Geschlechtscharakteristik.
19. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmtem Geschlecht gemäß Anspruch 6, wobei die Schritte der Bestimmung der Geschlechtscharakteristik einer Vielzahl der Spermazellen und des Sortierens dieser Spermazellen entsprechend der Bestimmung ihrer Geschlechtscharakteristik die Schritte umfaßt:
  - a. Herstellen einer Zellquelle, welche die zu sortierenden Zellen liefert;
  - b. chemisches Abstimmen einer Hüllflüssigkeit, um eine Hüllflüssigkeitsumgebung für die Zellen herzustellen, welche sowohl mit einer Vorsortierungs- als auch Nachsortierungsflüssigkeitsumgebung abgestimmt ist;
  - c. Bestimmung einer Eigenschaft der Zellen;

- d. Unterscheiden zwischen Zellen mit einer gewünschten Geschlechtscharakteristik;
  - e. Sammeln der Zellen mit der gewünschten Geschlechtscharakteristik.
20. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmtem Geschlecht gemäß Anspruch 1, worin die Schritte der Bestimmung der Geschlechtscharakteristik einer Vielzahl der Spermazellen und des Sortierens dieser Spermazellen entsprechend der Bestimmung ihrer Geschlechtscharakteristik die Schritte umfassen:
- a. Herstellen einer Zellquelle, welche zu sortierende Rinderspermaquellen liefert;
  - b. Herstellen einer Hüllflüssigkeit für die Rinderspermazellen, welche etwa 2,9% Natrium-Zitrat enthält;
  - c. Feststellen einer Eigenschaft besagter Zellen;
  - d. Unterscheidung zwischen Zellen, die die gewünschte Geschlechtscharakteristik besitzen;
  - e. Sammeln der Zellen mit der gewünschten Geschlechtscharakteristik.
21. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmtem Geschlecht gemäß Anspruch 1, wobei die Schritte der Bestimmung der Geschlechtscharakteristik einer Vielzahl der Spermazellen und des Sortierens dieser Spermazellen entsprechend der Bestimmung ihrer Geschlechtscharakteristik die Schritte umfaßt:
- a. Herstellen einer Zellquelle, welche zu sortierende Pferdespermaquellen liefert;
  - b. Herstellen einer Hüllflüssigkeit für die Pferdespermazellen, welche ein Hepes-gepuffertes Medium enthält;
  - c. Bestimmung einer Eigenschaft der Zellen;
  - d. Unterscheidung zwischen Zellen mit gewünschter Geschlechtscharakteristik;

- e. Sammeln der Zellen mit der gewünschten Geschlechtscharakteristik
22. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmtem Geschlecht gemäß Anspruch 1, wobei die Schritte der Bestimmung der Geschlechtscharakteristik einer Vielzahl der Spermazellen und des Sortierens dieser Spermazellen entsprechend der Bestimmung ihrer Geschlechtscharakteristik die Schritte umfaßt:
- a. Herstellung einer Zellquelle, welche die zu sortierenden Zellen liefert;
  - b. Herstellen einer Hüllflüssigkeit für die Zellen;
  - c. Bestimmung einer Eigenschaft dieser Zellen;
  - d. Unterscheidung zwischen Zellen mit gewünschter Geschlechtscharakteristik;
  - e. Sammeln der Zellen mit der gewünschten Geschlechtscharakteristik unter Abfederung des Aufpralls der Zellen mit Hilfe eines Sammelbehälters.
23. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmtem Geschlecht gemäß Anspruch 1, wobei die Schritte der Bestimmung der Geschlechtscharakteristik einer Vielzahl der Spermazellen und des Sortierens dieser Spermazellen entsprechend der Bestimmung ihrer Geschlechtscharakteristik die Schritte umfassen:
- a. Herstellung einer Zellquelle, welche zu sortierende Rinderspermazellen liefert;
  - b. Herstellen einer Hüllflüssigkeit für die Rinderspermazellen;
  - c. Feststellen einer Eigenschaft dieser Zellen;
  - d. Unterscheidung zwischen Zellen mit gewünschter Geschlechtscharakteristik;
  - e. Sammeln der Rinderspermazellen mit der gewünschten Geschlechtscharakteristik in einer Zitrat-Sammelflüssigkeit, die etwa 6% Eidotter vor dem Beginn des Sammelschrittes enthält.

24. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmtem Geschlecht, das den Schritt der Herstellung des Säugetiers unter Verwendung der Prozesse gemäß einem der Ansprüche 18, 19, 20, 21, 22 oder 23 umfaßt.
25. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmtem Geschlecht gemäß Anspruch 24, das weiter den Schritt des Sortierens der Zellen unter hoher Geschwindigkeit umfaßt.
26. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmtem Geschlecht gemäß Anspruch 1, weiter den Schritt des Gebrauchs eines Ovulationspharmazeutikums, um die Produktion einer Vielzahl von Eiern hervorzurufen und wobei der Schritt der Befruchtung von zumindest eines Eis innerhalb der weiblichen Spezies des Säugetiers mit Erfolgsleveln, die statistisch mit denjenigen vergleichbar sind, die mit der Dosierung bei der typischen geschlechtsunspezifischen künstlichen Befruchtung erreicht werden, den Schritt der Befruchtung einer Vielzahl dieser Eier zur Produktion von geschlechtsbestimmten Mehrfach-Embryos umfaßt.
27. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmtem Geschlecht gemäß Anspruch 26, worin der Schritt des Gebrauchs eines Ovulationspharmazeutikums, um die Produktion einer Vielzahl von Eiern zu bewirken, den Schritt der Injektion einer Dosierung eines Follikel stimulierenden Hormons mehrmals an einem Tag umfaßt.
28. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmtem Geschlecht gemäß Anspruch 27, wobei der Schritt der Injektion einer Dosierung von Follikel stimulierendem Hormon mehrmals am Tage den Schritt der Injektion des Follikel stimulierenden Hormons in etwa halbtägigen Abständen bei einem Dosierungslevel von 6,6,4,2,2,2 und 2 mg zwischen den Tagen 9 und 12 innerhalb des Östruszyklusses umfaßt und weiter den Schritt der Injektion von 25 bzw 12,5 von Prostaglandin F-2-alpha zusammen mit der 6. bzw. 7. Dosierung des Follikel stimulierenden Hormons umfaßt.
29. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmtem Geschlecht gemäß Anspruch 26, das weiter die Schritte umfaßt:

DE 198 82 943 T1

- a. Anfärben der Spermazellen eines männlichen Säugetiers;
  - b. Sortierung entsprechend des Geschlechts dieser Spermazellen durch den Gebrauch einer Hochgeschwindigkeitsflußzytometrie;
  - c. Konzentrierung dieser Spermazellen.
30. Verbessertes Flußzytometersystem zur Isolierung von gewünschten Zellen, das umfaßt:
- a. eine Zellquelle, welche die vom Flußzytometer zu analysierenden Zellen liefert;
  - b. eine Hüllflüssigkeit, welche eine Hüllflüssigkeitsumgebung für die Zellen schafft, welche etwa 2,9 % Natrium-Zitrat enthält;
  - c. eine Düse, durch die die Zellen passieren, während sie sich in der Hüllflüssigkeitsumgebung befinden;
  - d. ein Oszillator, welcher auf die Hüllflüssigkeit wirkt, während sie durch die Düse tritt
  - e. ein Zellensensorsystem, welches auf die Zellen anspricht
  - f. ein Sortierungs-Unterscheidungssystem, welches so wirkt, daß Zellen mit einer gewünschten Charakteristik aussortiert werden und
  - g. ein Sammler, in welchen die Zellen mit einer gewünschten Charakteristik plaziert werden.
31. Verbessertes Flußzytometersystem zur Isolation von gewünschten Zellen gemäß Anspruch 30, worin die Zellquelle Rinderspermazellen umfaßt.
32. Verbessertes Flußzytometersystem zur Isolation von gewünschten Zellen, das umfaßt:
- a. eine Zellquelle, welche vom Flußzytometer zu analysierende Zellen liefert;
  - b. eine Hüllflüssigkeit, welche eine Hüllflüssigkeitsumgebung für die Zellen schafft, welche ein Hepes-gepuffertes Medium enthält;

- c. eine Düse, durch die die Zellen passieren, während sie sich in der Hüllflüssigkeitsumgebung befinden;
  - d. ein Oszillator, welcher auf die Hüllflüssigkeit wirkt, während sie durch die Düse tritt
  - e. ein Zellsensorsystem, welches auf die Zellen anspricht
  - f. ein Sortierungs-Unterscheidungssystem, welches so wirkt, daß Zellen mit einer gewünschten Charakteristik aussortiert werden und
  - g. ein Sammler, in welchen die Zellen mit einer gewünschten Charakteristik plaziert werden.
33. Verbessertes Flußzytometersystem zur Isolation von gewünschten Zellen gemäß Anspruch 32, wobei die Zellquelle Pferdespermazellen umfaßt.
34. Verbessertes Flußzytometersystem zur Isolation von gewünschten Zellen, das umfaßt:
- a. eine Zellquelle, die die vom Flußzytometer zu analysierenden Zellen liefert;
  - b. eine Hüllflüssigkeitsquelle, welche eine Hüllflüssigkeitsumgebung für die Zellen schafft;
  - c. eine Düse, durch welche die Zellen passieren, während sie sich in der Hüllflüssigkeitsumgebung befinden;
  - e. einen Oszillator, welcher auf die Hüllflüssigkeit wirkt, während sie durch die Düse tritt;
  - d. ein Zellsensorsystem, welches auf die Zellen anspricht;
  - f. ein Sortierungs-Unterscheidungssystem, welches so wirkt, daß Zellen mit einer gewünschten Charakteristik aussortiert werden und
  - g. einen Sammler, in welchen Zellen mit einer gewünschten Charakteristik plaziert werden und welcher eine Zitrat-Sammelflüssigkeit umfaßt, die etwa 6% Eidotter enthält.

35. Verbessertes Flußzytometersystem zur Isolation von gewünschten Zellen gemäß Anspruch 34, worin die Hüllflüssigkeitsquelle eine Lösung mit etwa 2,9 % Natrium-Zitrat umfaßt.
36. Verbessertes Flußzytometersystem zur Isolation von gewünschten Zellen gemäß Anspruch 34 oder 35, worin die Zellquelle Rinderspermazellen umfaßt.
37. Verbessertes Flußzytometersystem zur Isolation von gewünschten Zellen umfassend:
  - a. eine Zellquelle, welche vom Flußzytometer zu analysierende Zellen liefert;
  - b. eine Hüllflüssigkeitsquelle, welche eine Hüllflüssigkeitsumgebung für die Zellen schafft;
  - c. eine Düse, durch welche die Zellen passieren, während sie sich in der Hüllflüssigkeitsumgebung befinden;
  - e. einen Oszillator, welcher auf die Hüllflüssigkeit wirkt, während sie durch die Düse tritt;
  - d. ein Zellsensorsystem, welches auf die Zellen anspricht;
  - f. ein Sortierungs-Unterscheidungssystem, welches so wirkt, daß Zellen mit einer gewünschten Charakteristik aussortiert werden und
  - g. einen Sammler, in welchen die Zellen mit einer gewünschten Charakteristik plaziert werden und welcher ein Testrohr mit physikalischen Charakteristiken eines stromangepaßten Behälters umfaßt.
38. Verbessertes Flußzytometersystem zur Isolation von gewünschten Zellen gemäß Anspruch 37, worin die Zellquelle umfaßt, die mechanisch empfindlich sind.
39. Verbessertes Flußzytometersystem zur Isolation von gewünschten Zellen gemäß Anspruch 30, 32 oder 34, worin die Zellquelle Zellen die auf eine chemische Zusammensetzung in einer umgebenden Flüssigkeitsumgebung hyper-ansprechempfindlich sind, umfaßt.

51  
-12-

30.05.00

DE 198 82 943 T1

40. Ein verbessertes Flußzytometersystem zur Isolation von gewünschten Zellen gemäß Ansprüchen 30, 32, 34 oder 37, worin der Sammler gebraucht wird, um eine niedrige Dosierung von Spermien bereitzustellen.
41. Verbessertes Flußzytometersystem zur Isolation von gewünschten Zellen gemäß Anspruch 40, worin die Düse, der Oszillator, das Zellsensorsystem und das Sortierungs-Unterscheidungssystem Teil eines Flußzytometersystems sind, und worin das Flußzytometersystem einen Hochgeschwindigkeitssortierer umfaßt.
42. Verbessertes Flußzytometersystem zur Isolation von gewünschten Zellen gemäß Anspruch 37, worin die Düse, der Oszillator, das Zellsensorsystem und das Sortierungs-Unterscheidungssystem Teil eines Flußzytometersystems sind, und worin das Flußzytometersystem einen Hochgeschwindigkeitssortierer umfaßt.
43. Geschlechtsbestimmte Spermaprobe, die entsprechend eines Systems wie in einem der Ansprüche 30, 32, 34, 35, 37, 51, 59, 63, 105, 107, 88 oder 101 hergestellt ist.
44. Geschlechtsbestimmte Spermaprobe gemäß Anspruch 43, worin der Sammler dazu gebraucht wird, eine geringe Dosierung von Spermien bereitzustellen.
45. Geschlechtsbestimmte Spermaprobe gemäß Anspruch 43, worin die Düse, der Oszillator, das Zellsensorsystem und das Sortierungs-Unterscheidungssystem Teil eines Flußzytometersystems sind, und worin das Flußzytometersystem einen Hochgeschwindigkeitssortierer umfaßt.
46. Geschlechtsbestimmte Spermaprobe gemäß Anspruch 44, worin der Sammler dazu gebraucht wird, eine geringe Dosierung von Spermien bereitzustellen.
47. Säugetier, das durch die Verwendung von geschlechtsbestimmten Spermaproben, die mit einem System hergestellt wurden wie in einem der Ansprüche 30, 32, 34, 35, 37, 51, 59, 63, 105, 107, 88 oder 101 beschrieben sind, hergestellt wurde.



48. Säugetier gemäß Anspruch 47, worin das Säugetier durch die Benutzung einer niedrigen Dosierung von Sperma hergestellt wurde.
49. Säugetier gemäß Anspruch 47, worin die Düse, der Oszillator, das Zellsensorsystem und das Sortierungs-Unterscheidungssystem Teil eines Flußzytometersystems sind, und worin das Flußzytometersystem einen Hochgeschwindigkeitssortierer umfaßt.
50. Säugetier gemäß Anspruch 48, worin das Säugetier durch den Gebrauch einer niedrigen Dosierung von Sperma hergestellt wurde.
51. Ein verbessertes Flußzytometersystem zur Isolation von gewünschten Zellen umfassend:
  - a. eine Zellquelle, welche vom Flußzytometer zu analysierende Zellen liefert;
  - b. eine chemisch abgestimmte Hüllflüssigkeitsquelle, welche eine Hüllflüssigkeitsumgebung für die Zellen schafft, und welche so ausgewählt ist, daß sie mit sowohl mit der Vorsortierungs- als auch der Nachsortierungszellflüssigkeitsumgebung abgestimmt ist;
  - c. eine Düse, durch welche die Zellen passieren, während sie sich in der Hüllflüssigkeitsumgebung befinden;
  - d. einen Oszillator, welcher auf die Hüllflüssigkeit wirkt, während sie durch die Düse tritt;
  - e. ein Zellsensorsystem, welches auf die Zellen anspricht;
  - f. ein Sortierungs-Unterscheidungssystem, welches so wirkt, daß Zellen mit gewünschter Charakteristik aussortiert werden und
  - g. einen Sammler, in welchen die Zellen mit gewünschter Charakteristik platziert werden.
52. Verbessertes Flußzytometersystem zur Isolation von gewünschten Zellen gemäß Anspruch 51, worin die Vorsortierungs- und Nachsortierungszellflüssigkeitsumgebungen zumindest eine hyper-ansprechempfindliche chemische Zusammensetzung enthalten, auf welche die Zellen besonders

ansprechen, und worin die chemisch abgestimmte Hüllflüssigkeitsquelle Veränderungen dieser hyper-ansprechempfindlichen chemischen Zusammensetzung minimiert.

53. Verbessertes Flußzytometersystem zur Isolation von gewünschten Zellen gemäß Anspruch 52, wobei die hyper-ansprechempfindliche chemische Zusammensetzung eine metabolische chemische Zusammensetzung umfaßt.
54. Verbessertes Flußzytometersystem zur Isolation von gewünschten Zellen gemäß Anspruch 52, worin die hyper-ansprechempfindliche chemische Zusammensetzung ein Zitrat umfaßt.
55. Verbessertes Flußzytometersystem zur Isolation von gewünschten Zellen gemäß Anspruch 51, worin die Zellquelle die Vorsortierungszellflüssigkeitsumgebung schafft und worin der Sammler die Nachsortierungszellflüssigkeitsumgebung schafft.
56. Verbessertes Flußzytometersystem zur Isolation von gewünschten Zellen gemäß Anspruch 52, wobei die Zellquelle nicht-reparierende Zellen umfaßt.
57. Verbessertes Flußzytometersystem zur Isolation von gewünschten Zellen gemäß Anspruch 56, worin die Zellquelle Zellen umfaßt, die eine nicht-transcribierende DNS besitzen.
58. Ein verbessertes Flußzytometersystem zur Isolation von gewünschten Zellen gemäß Anspruch 56, worin die Zellquelle Zellen umfaßt, die eine nicht-replizierende DNS haben.
59. Verbessertes Flußzytometersystem zur Isolation von gewünschten Zellen gemäß Anspruch 56, worin die Zellquelle Spermazellen umfaßt.
60. Verbessertes Flußzytometersystem zur Isolation von gewünschten Zellen gemäß Anspruch 52 oder 54, worin die Zellquelle Rinderspermazellen umfaßt.
61. Ein verbessertes Flußzytometersystem zur Isolation von gewünschten Zellen gemäß Anspruch 52, worin die Zellquelle Pferdespermazellen umfaßt.

54  
-15- 30.08.00

DE 198 82 943 T1

62. Verbessertes Flußzytometersystem zur Isolation von gewünschten Zellen gemäß Anspruch 51, worin die Zellquelle Zellen umfaßt, welche hyperansprechempfindlich auf eine chemische Zusammensetzung einer Hüllflüssigkeitsumgebung sind.
63. Verbessertes Flußzytometersystem zur Isolation von gewünschten Zellen gemäß Anspruch 59, worin der Sammler dazu gebraucht wird, um eine niedrige Dosierung der Spermien bereitzustellen.
64. Verbessertes Flußzytometersystem zur Isolation von gewünschten Zellen gemäß Anspruch 63, worin die niedrige Dosierung der Spermien eine Dosierung von weniger als etwa 10% der typischen Dosierung umfaßt.
65. Verbessertes Flußzytometersystem zur Isolation von gewünschten Zellen gemäß Anspruch 63, worin die Spermazellen Rinderspermazellen umfassen und worin die niedrige Dosierung der Spermien eine Dosierung von weniger als etwa 500.000 Spermien umfaßt.
66. Verbessertes Flußzytometersystem zur Isolation von gewünschten Zellen gemäß Anspruch 63, worin die Spermazellen Rinderspermazellen umfassen und worin die niedrige Dosierung der Spermien eine Dosierung von weniger als etwa 300.000 Spermazellen umfaßt.
67. Verbessertes Flußzytometersystem zur Isolation von gewünschten Zellen gemäß Anspruch 63, worin die Spermazellen Pferdespermazellen umfassen und worin die niedrige Dosierung der Spermien eine Dosierung von weniger als etwa 10.000.000 Spermazellen umfaßt.
68. Verbessertes Flußzytometersystem zur Isolation von gewünschten Zellen gemäß Anspruch 54, worin die chemisch abgestimmte Hüllflüssigkeitsquelle eine Lösung umfaßt, die etwa 2,9 % Natrium-Zitrat enthält.
69. Verbessertes Flußzytometersystem zur Isolation von gewünschten Zellen gemäß Anspruch 68, worin die Zellquelle Rinderspermazellen umfaßt.
70. Verbessertes Flußzytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen umfassend:
  - a) eine Zellquelle, welche vom Flußcytometer zu analysierende Quellen liefert;

- b) eine Hüllflüssigkeitsquelle, die eine Hüllflüssigkeitsumgebung für die Zellen schafft, welche eine Lösung umfaßt, die etwa 2,9 % Natriumcitrat enthält;
  - c) eine Düse, durch welche die Zellen passieren, während sie der Hüllflüssigkeitsumgebung ausgesetzt sind;
  - d) einen Oszillator, welcher auf die Hüllflüssigkeit wirkt, während sie durch die Düse tritt;
  - e) ein Zellsensorsystem, welches auf die Zellen anspricht;
  - f) ein Sortierungs-Unterscheidungssystem, welches so wirkt, daß Zellen mit einer gewünschten Charakteristik aussortiert werden und
  - g) einen Sammler, in welchen die Zellen mit einer gewünschten Charakteristik plaziert werden.
71. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 69, worin der Sammler dazu benutzt wird, um Sperma für die künstliche Befruchtung bereitzustellen.
72. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 69, worin der Sammler dazu benutzt wird, um eine niedrige Dosierung von Spermien für die künstliche Befruchtung bereitzustellen.
73. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 54, worin die chemisch abgestimmte Hüllflüssigkeitsquelle eine Lösung umfaßt, die ein Hepes-gepuffertes Medium enthält.
74. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 73, worin die Zellquelle Rinderspermazellen umfaßt.
75. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen, umfassend:
- a) eine Zellquelle, welche die vom Flußcytometer zu analysierenden Zellen liefert;

DE 198 82 943 T1

- b) eine Hüllflüssigkeitsquelle, welche eine Hüllflüssigkeitumgebung für die Zellen schafft und welche eine Lösung umfaßt, die Hepes-gepuffertes Medium enthält;
  - c) eine Düse, durch welche die Zellen passieren, während sie sich in der Hüllflüssigkeitumgebung befinden;
  - d) einen Oszillator, welcher auf die Hüllflüssigkeit wirkt, während sie durch die Düse tritt;
  - e) ein Zellsensorsystem, welches auf die Zellen anspricht;
  - f) ein Sortierungs-Unterscheidungssystem, welches so wirkt, daß Zellen mit einer gewünschten Charakterisitk aussortiert werden und
  - g) einen Sammler, in welchem die Zellen mit der gewünschten Charakteristik plaziert werden.
76. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 74, worin der Sammler dazu benutzt wird, um Sperma für die künstliche Befruchtung bereitzustellen.
77. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 74, worin der Sammler dazu benutzt wird, um eine niedrigere Dosierung von Spermien für die künstliche Befruchtung bereitzustellen.
78. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Ansprüchen 51, 52, 54, 59, 72 oder 77, worin die Düse, der Oszillator, das Zellsensorsystem und das Sortierungs-Unterscheidungssystem Teil des Flußcytometersystems sind und worin das Flußcytometersystem einen Hochgeschwindigkeitszellsortierer umfaßt.
79. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 78, worin der Hochgeschwindigkeitssortierer die zu analysierenden Zellen mit einer Rate von zumindest 500 Sortierschritten pro Sekunde sortiert.
80. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 78, worin der Hochgeschwindigkeitssortierer bei einem Druck von zumindest etwa 50 pounds per square inch betrieben wird.

81. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 59, worin der Sammler einen Behälter mit einem Abfederungselement umfaßt.
82. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 81, worin der Behälter eine weite Sammelröhre umfaßt.
83. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen, umfassend
- a) eine Zellquelle, welche die vom Flußcytometer zu analysierenden Rinderspermazellen liefert;
  - b) eine chemisch abgestimmte Hüllflüssigkeitsquelle, welche eine Hüllflüssigkeitsumgebung für die Zellen schafft, und welche etwa 2,9 % Natriumcitrat enthält;
  - c) eine Düse, durch welche die Zellen passieren, während sie sich in der Hüllflüssigkeitsumgebung befinden,
  - d) einen Oszillator, welcher auf die Hüllflüssigkeit wirkt, während sie durch die Düse tritt;
  - e) ein Zellsensorsystem, welches auf die Zellen anspricht;
  - f) ein Sortierungs-Unterscheidungssystem, welches so wirkt, daß Zellen mit einer gewünschten Charakteristik aussortiert werden, die einen Sammler, in welchen die Zellen mit der gewünschten Charakteristik plziert werden, welcher eine Citratsammelflüssigkeit enthält, die etwa 6% Eidotter umfaßt, und der dazu verwendet wird, eine Dosierung von weniger als etwa 500 000 Spermien bereitzustellen;
- und worin die Düse, der Oszillator, das Zellsensorsystem und das Sortierungs-Unterscheidungssystem Teil eines Flußcytometersystems sind, welches die zu analysierenden Zellen mit einer Rate von zumindest etwa 500 Soertierungsschritten pro Sekunde sortiert und bei einem Druck von zumindest etwa 50 pounds per square inch betrieben wird.
84. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen, umfassend:

- a) eine Zellquelle, welche vom Flußcytometer zu analysierende Pferdespermazellen bereitstellt;
- b) eine chemisch abgestimmte Hüllflüssigkeitsquelle, welche eine Hüllflüssigkeitsumgebung für die Zellen schafft und welche ein Hepes-gepuffertes Medium enthält;
- c) eine Düse, durch welche Zellen passieren, während sie sich in der Hüllflüssigkeitsumgebung befinden;
- d) einen Oszillator, welcher auf die Hüllflüssigkeit wirkt, die durch die Düse tritt;
- e) ein Zellsensorsystem, welches auf die Zellen anspricht;
- f) ein Sortierungs-Unterscheidungssystem, welches so wirkt, daß Zellen mit einer gewünschten Charakteristik aussortiert werden;
- g) einen Sammler, in welchen Zellen mit der gewünschten Charakteristik platziert werden und welcher eine Sammelflüssigkeit enthält, die ein Hepes-gepuffertes Medium umfaßt und welcher dazu gebraucht wird, um eine Dosierung von weniger als etwa 10 Millionen Spermien bereitzustellen;

und worin die Düse, der Oszillator, das Zellsensorsystem, das Sortierungs-Unterscheidungssystem Teil eines Flußcytometersystems sind, welches die zu analysierenden Zellen mit einer Rate von zumindest etwa 500 Sortierungsschritten pro Sekunde sortiert und bei einem Druck von zumindest 50 pounds per square inch betrieben wird.

85. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen, umfassend:

- a) eine Zellquelle, die vom Flußcytometer zu analysierende Zellen liefert;
- b) ein Mittel zur Minimierung der Änderungen zwischen einer Hüllflüssigkeitsumgebung der Zellen und sowohl einer Vorsortierungs- als auch Nachsortierungszellflüssigkeitsumgebung;
- c) eine Düse, durch welche die Zellen passieren, während sie sich in der Hüllflüssigkeitsumgebung befinden;

- d) einen Oszillator, welcher auf die Hüllflüssigkeit wirkt, während sie durch die Düse tritt;
  - e) ein Zellsensorsystem, welches auf die Zellen anspricht;
  - f) ein Sortierungs-Unterscheidungssystem, welches so wirkt, daß Zellen mit einer gewünschten Charakteristik aussortiert werden und
  - g) ein Sammler, in welchem Zellen mit der gewünschten Charakteristik platziert werden.
86. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 85, worin das Mittel zur Minimierung der Änderungen zwischen der Hüllflüssigkeitsumgebung und sowohl der Vorsortierungs- als auch der Nachsortierungsflüssigkeitsumgebung die Hüllflüssigkeit umfaßt.
87. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 85 oder 86, worin der Sammler eine Sammlerflüssigkeit besitzt und worin das Mittel zur Minimierung der Veränderungen zwischen der Hüllflüssigkeitsumgebung der Zellen und sowohl der Vorsortierungs- als auch der Nachsortierungszellflüssigkeitsumgebung die Sammelflüssigkeit umfaßt.
88. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen, umfassend:
- a) eine Zellquelle, welche vom Flußcytometer zu analysierende Zellen liefert;
  - b) eine Hüllflüssigkeitsquelle, welche eine Hüllflüssigkeitsumgebung für die Zellen schafft,;
  - c) eine Düse, welche die Zellen passieren, während sie sich in der Hüllflüssigkeitsumgebung befinden;
  - d) einen Oszillator, welcher auf die Hüllflüssigkeit wirkt, während sie durch die Düse tritt;
  - e) ein Zellsensorsystem, welches auf die Zellen anspricht;
  - f) ein Sortierungs-Unterscheidungssystem, welches so wirkt, daß Zellen mit einer gewünschten Charakteristik aussortiert werden und



- g) einen Sammler, in welchen Zellen mit einer gewünschten Charakteristik plaziert werden und welcher chemisch abgestimmte Sammelflüssigkeit Hüllflüssigkeitsquelle umfaßt, welcher eine Sammelflüssigkeitsumgebung für die Zellen umfaßt, welche so ausgewählt ist, daß sie mit einer vorhergehenden Zellflüssigkeitsumgebung abgestimmt ist.
89. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 88, worin die Sammlerflüssigkeit Nährstoffe enthält, welche so abgestimmt sind, um den Level der Nährstoffe nach der Beendigung des Sortierungsvorgangs der Zellen auszugleichen.
90. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 89, worin die Sammlerflüssigkeit eine Citratlösung umfaßt, die etwa 6 % Eidotter enthält.
91. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 89 oder 90, worin die Zellquelle, welche Zellen umfaßt, die hyperansprechempfindlich auf eine gemischte Zusammensetzung der Sammelflüssigkeitsumgebung sind.
92. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 88 oder 89, worin die Zellquelle Spermazellen umfaßt.
93. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 90, worin die Zellquelle Rinderspermazellen umfaßt.
94. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 88, worin der Sammler benutzt wird, um eine niedrige Dosierung von Spermien bereitzustellen.
95. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß anspruch 94, worin die niedrige Dosierung von Spermien eine Dosierung von weniger als etwa 10 % der typischen Dosierung umfaßt.
96. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß anspruch 94, worin die Spermazellen Rindersprmazellen umfassen und worin die niedrige Dosierung der Spermien eine Dosierung von weniger als etwa 500 000 Spermien umfaßt.

61  
-22- 00.08.00

DE 198 82 943 T1

97. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 94, worin die Spermazellen Rinderspermazellen umfassen und worin die niedrige Dosierung der Spermien eine Dosierung von weniger als etwa 300 000 Spermien umfaßt.
98. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 88, 93 oder 94, worin die Düse, der Oszillator, das Zellsensorsystem und das Sortierungs-Unterscheidungssystem Teile eines Flußcytometersystems sind und worin das Flußcytometersystem einen Hochgeschwindigkeitszellsortierer umfaßt.
99. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 98, worin der Hochgeschwindigkeitszellsortierer die zu analysierenden Zellen mit einer Rate von zumindest etwa 500 Sortierungsschritten pro Sekunde sortiert.
100. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 98, worin der Hochgeschwindigkeitszellsortierer mit einem Druck von zumindest 50 pounds per square inch betrieben wird.
101. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 88, worin die Hüllflüssigkeitsquelle eine chemisch abgestimmte Hüllflüssigkeitsquelle umfaßt, die eine Hüllflüssigkeitsumgebung für die Zellen schafft, die so ausgewählt ist, daß sie sowohl mit einer Vorsortierungs- als auch mit einer Nachsortierungsflüssigkeitsumgebung der Zellen abgestimmt ist.
102. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 101, worin die chemisch abgestimmte Hüllflüssigkeitsquelle eine Lösung umfaßt, die etwa 2,9 % Natriumcitrat enthält.
103. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen, umfassend:
  - a) eine Zellquelle, welche die vom Flußcytometer zu analysierenden Zellen liefert;
  - b) eine Hüllflüssigkeitsquelle, welche eine Hüllflüssigkeitsumgebung für die Zellen schafft;



DE 198 82 943 T1

- c) eine Düse, durch welche die Zellen passieren, während sie sich in der Hüllflüssigkeitsumgebung befinden;
  - d) einen Oszillator, welcher auf die Hüllflüssigkeit wirkt, während sie durch die Düse tritt;
  - e) ein Zellsensorsystem, welches auf die Zellen anspricht;
  - f) ein Sortierungs-Unterscheidungssystem, welches so wirkt, daß es Zellen mit gewünschter Charakteristik aussortiert und
  - g) einen Sammler, welcher ein Abfederungselement umfaßt.
104. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 103, worin der Sammler einen Behälter umfaßt, der ein Abfederungselement umfaßt.
105. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 104, worin der Behälter eine weite Sammelröhre umfaßt.
106. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 105, worin die weite Sammelröhre zumindest etwa 15 mm weit ist.
107. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 10, worin der Behälter ein Teströhrchen mit den physikalischen Charakteristika eines stromangepaßten Behälters umfaßt.
108. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 104, worin die Zellquelle Zellen umfaßt, die mechanisch empfindlich sind.
109. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß anspruch 104, worin die Zellquelle Spermazellen umfaßt.
110. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Ansprüchen 88, 90 oder 93, worin der Sammler ein Abfederungselement umfaßt.
111. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß anspruch 110, worin der Sammler einen Behälter umfaßt, der ein Abfederungselement umfaßt.

63  
-24- 00.05.00

DE 198 82 943 T1

112. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 111, worin der Behälter eine weite Sammelröhre umfaßt.
113. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 112, worin die weite Sammelröhre mindestens etwa 15 mm weit ist.
114. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 88, worin der Behälter ein Teströhrchen mit physikalischen Charakteristika eine stromangepaßten Behälters umfaßt.
115. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 112, worin die Zellquelle Zellen umfaßt, die mechanisch empfindlich sind.
116. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 115, worin die Zellquelle Spermazellen umfaßt.
117. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 108, worin die Düse, der Oszillator, das Zellsensorsystem und das Sortierungs-Unterscheidungssystem Teil eines Flußcytometersystems sind und worin das Flußcytometersystem einen Hochgeschwindigkeitszellensortierer umfaßt.
118. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 117, worin der Hochgeschwindigkeitsszellenortierer die zu analysierenden Zellen mit einer Rate von zumindest etwa 500 Sortierungsschritten pro Sekunde sortiert.
119. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen gemäß Anspruch 117, worin der Hochgeschwindigkeitszellensortierer bei einem Druck von zumindest etwa 50 pounds per square inch betrieben wird.
120. Verbessertes Flußcytometersystem zur Isolation gewünschter Zellen, umfassend:
  - a) eine Zellquelle, welche die im Flußcytometer zu analysierenden Zellen liefert;
  - b) eine Hüllflüssigkeitsquelle, welche Hüllflüssigkeitsumgebung für die Zellen schafft;

64  
- 25 00.05.00

DE 198 82 943 T1

- c) eine Düse, durch welche die Zellen hindurchtreten, während sie sich in der Hüllflüssigkeitsumgebung befinden;
  - d) einen Oszillator, welcher auf die Hüllflüssigkeit wirkt, während sie durch die Düse hindurchtritt;
  - e) ein Zellsensorsystem, welches auf die Zellen anspricht;
  - f) ein Sortierungs-Unterscheidungssystem, welches so wirkt, daß die Zellen mit einer gewünschten Charakteristik aussortiert werden und
  - g) einen Sammler, welcher ein Mittel umfaßt, um den Aufprall zwischen den Zellen und dem Sammler zu vermeiden.
121. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmbarem Geschlecht umfassend die Schritt:
- a) Sammeln von Spermazellen von einer männlichen Spezies des Säugetiers;
  - b) Bestimmen der Geschlechtscharakteristik einer Vielzahl dieser Spermazellen;
  - c) Sortieren dieser Spermazellen entsprechend der Bestimmung ihrer Geschlechtscharakteristik;
  - d) Herstellen einer Befruchtungsprobe, die eine geringe Anzahl dieser Spermazellen im Vergleich zu der Dosierung bei der typischen künstlichen Befruchtung enthält.
  - e) Einführung von zumindest eines Teils der Befruchtungsprobe in eine weibliche Spezies des Säugetiers.
  - f) Befruchtung von zumindest einem Ei innerhalb der weiblichen Spezies des Säugetiers.
  - g) Herstellen eines Säugetierabkömmlings des gewünschten Geschlechts.
122. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmtem Geschlecht gemäß Anspruch 121, worin der Schritt des Sammelns von Spermazellen von einer männlichen Spezies des Säugetiers ausgewählt aus der Gruppe von Rindern und Pferden umfaßt.

65  
26 20.05.00

DE 198 82 943 T1

123. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmtem Geschlecht gemäß Anspruch 121, worin der Schritt des Herstellens einer Befruchtungsprobe, die eine geringe Anzahl Spermazellen im Vergleich zu der Dosierung bei der typischen künstlichen Befruchtung enthält, den Schritt des Herstellens einer Befruchtungsprobe mit nicht mehr als 10% der typischen Anzahl von Spermien, wie sie in einem typischen nicht geschlechtsspezifischen künstlichen Befruchtungsereignis verwendet werden, umfaßt.
124. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmtem Geschlecht gemäß Anspruch 121, worin der Schritt des Herstellens einer Befruchtungsprobe, die eine geringe Anzahl der Spermazellen im Vergleich zu der Dosierung bei der typischen künstlichen Befruchtung enthält, den Schritt des Herstellens einer Befruchtungsprobe aus der Gruppe bestehend aus einer Rinderbefruchtungsprobe mit nicht mehr als 100.000 Spermazellen, einer Rinderbefruchtungsprobe mit nicht mehr als 250.000 Spermazellen, einer Rinderbefruchtungsprobe mit nicht mehr als 300.000 Spermazellen, einer Pferdebefruchtungsprobe mit nicht mehr als 1 Million Spermazellen, einer Pferdebefruchtungsprobe mit nicht mehr als 5.000.000 Spermazellen, einer Pferdebefruchtungsprobe mit nicht mehr als 10.000.000 Spermazellen und einer Pferdebefruchtungsprobe mit nicht mehr als 25.000.000 Spermazellen ausgewählt wird.
125. Verfahren zur Herstellung von Säugetieren vorherbestimmtem Geschlechts gemäß Anspruch 121, worin die Schritte der Einführung von zumindest eines Teils der Befruchtungsprobe in eine weibliche Spezies des Säugetiers und die Befruchtung von zumindest einem Ei innerhalb der weiblichen Spezies des Säugetiers in einer Feldumgebung durchgeführt wird.
126. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmtem Geschlecht gemäß 121, worin der Schritt Einführung von zumindest eines teils der Befruchtungsprobe in eine weibliche Spezies des Säugetiers weiter den Schritt der Einführung der Befruchtungsprobe innerhalb des Uterushorns mit Hilfe des Gebrauchs von Embryotransfergerät umfaßt.
127. Verfahren zur Herstellung von Säugetieren mit vorherbestimmtem Geschlecht gemäß des Anspruchs 121, worin der Schritt der Bestimmung der Geschlechtscharakteristik einer Vielzahl von Spermazellen den Schritt des Anfärbens der Zellen mit einer hohen Konzentration an Anfärbemittel umfaßt.

66  
27.08.00

DE 198 82 943 T1

128. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit vorherbestimmtem Geschlecht gemäß Anspruch 121, worin die Schritte der Bestimmung der geschlechtscharakteristik einer Vielzahl der Spermazellen und des Sortierens dieser Spermazellen entsprechend der Bestimmung ihrer Geschlechtscharakteristik die Schritte umfassen:
- a. Herstellung einer Zellquelle, welche die zu sortierenden Zellen beliefert
  - b. Chemisches Abstimmen einer Hüllflüssigkeit, um Hüllflüssigkeitsumgebung für die Zellen zu schaffen, welche sowohl mit einer Vorsortierung als auch einer Nachsortierungszellflüssigkeitsumgebung abgestimmt ist.
  - c. Bestimmung einer Eigenschaft der Zellen
  - d. Unterscheidung zwischen Zellen mit einer gewünschten Geschlechtscharakteristik
  - e. Sammeln von Zellen der gewünschten Geschlechtscharakteristik
129. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit einem gewünschten Geschlecht, die Schritte Produktion dieses Säugetiers, der Gebrauch der Prozesse entsprechend eines der Ansprüche 18, 19, 20, 21, 22 oder 23, umfassend.
130. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit gewünschtem Geschlecht gemäß Anspruch 124, umfassend den Schritt der Sortierung der Zellen bei hoher Geschwindigkeit.
131. Verfahren zur Sortierung von Zellen umfassend die Schritte:
- a. Herstellung einer Zellquelle, welche die zu sortierenden Zellen liefert.
  - b. Chemische Abstimmung einer Hüllflüssigkeit, um eine Hüllflüssigkeitsumgebung für diese Zellen zu schaffen, welche sowohl mit einer Vorsortierung als auch mit einer Nachsortierungszellflüssigkeitsumgebung abgestimmt ist.
  - c. Bestimmung einer Eigenschaft der Zellen
  - d. Unterscheidung zwischen Zellen mit gewünschter Charakteristik
  - e. Sammeln der Zellen mit der gewünschten Charakteristik

67  
28.08.00

DE 198 82 943 T1

132. Verfahren zur Sortierung von Zellen gemäß Anspruch 131, weiter umfassend den Schritt der Minimierung der chemischen Änderungen, denen die Zellen ausgesetzt sind als Ergebnis der Aussetzung zu dieser Hüllflüssigkeit.
133. Verfahren zur Sortierung von Zellen gemäß Anspruch 132, worin der Schritt des Herstellens einer Zellquelle den Schritt des Herstellens einer Quelle von nicht reparierenden Zellen umfaßt.
134. Verfahren zur Herstellung zur Sortierung von Zellen gemäß Anspruch 123, worin der Schritt des Herstellens einer Zellquelle den Schritt des Herstellens einer Zellquelle von Spermazellen umfaßt.
135. Verfahren zur Sortierung von Zellen gemäß Anspruch 132, worin der Schritt des Herstellens einer Zellquelle den Schritt des Herstellens einer Quelle von Rinderspermazellen umfaßt.
136. Verfahren zur Sortierung von Zellen gemäß Anspruch 132, worin der Schritt des Herstellens einer Zellquelle den Schritt des Herstellens einer Quelle von PferdeSpermazellen umfaßt.
137. Verfahren zur Sortierung von Zellen gemäß Anspruch 134 weiter umfassend den Schritt der Befruchtung eines Säugetiers unter Gebrauch einer niedrigen Dosierung der Spermazellen.
138. Verfahren zur Sortierung von Zellen gemäß Anspruch 135, worin der Schritt der chemischen Abstimmung einer Hüllflüssigkeit um eine Hüllflüssigkeitsumgebung der Zellen zu schaffen, welche mit sowohl einer Vorsortierungs als auch einer Nachsortierungsflüssigkeitsumgebung abgestimmt ist, den Schritt des Herstellens einer Hüllflüssigkeit umfaßt, welche etwa 2,9% Natriumzytrat enthält.
139. Verfahren zur Sortierung von Zellen gemäß Anspruch 136, worin der Schritt der chemischen Abstimmung einer Hüllflüssigkeit zur Schaffung einer Hüllflüssigkeitsumgebung für diese Zellen, welche mit einer Vorsortierungs und einer Nachsortierungszellflüssigkeitsumgebung abgestimmt ist den Schritt umfaßt, des Herstellens einer Flüssigkeit, welche ein Hepes-gepuffertes Medium umfaßt.



68  
29.08.00

DE 198 82 943 T1

140. Verfahren zur Sortierung von Zellen gemäß Ansprüchen 121, 122 oder 134, weiter umfassend den Schritt zur Sortierung der Zellen bei hoher Geschwindigkeit.
141. Verfahren zur Sortierung von Zellen gemäß Anspruch 140, worin der Schritt der Sortierung der Zellen bei hoher Geschwindigkeit den Schritt des Aussetzens der Zellen zu einem Druck von mindestens 50 pounds per square inch umfaßt.
142. Verfahren zur Sortierung von Zellen gemäß Anspruch 134, worin der Schritt des Sammelns von Zellen mit der Gewünschten Charakteristik den Schritt des Abfederns der Zellen vom Aufprall mit einem Sammelbehälter umfaßt.
143. Verfahren zur Sortierung von Zellen gemäß Anspruch 142, worin der Schritt des Abfederns der Zellen vom Aufprall mit einem Sammelbehälter weiter den Schritt der Bereitstellung einer weiten Öffnung des Behälters umfaßt.
144. Verfahren zur Sortierung von Zellen umfassend die Schritte:
  - a. Erstellung einer Zellquelle, welche die zu sortierenden Zellen liefert
  - b. Herstellung einer Hüllflüssigkeit um eine Hüllflüssigkeitsumgebung für diese Zellen zu schaffen
  - c. Feststellung einer Eigenschaft der Zellen
  - d. Unterscheidung zwischen Zellen mit einer gewünschten Geschlechtscharakteristik
  - e. Sammeln der Zellen mit der gewünschten Geschlechtscharakteristik in einer Sammelflüssigkeit und
  - f. chemisches Abstimmen der Sammelflüssigkeit um eine Endsammelflüssigkeitsumgebung für die Zellen zu schaffen, welche mit einer Vorsortierungsflüssigkeitsumgebung abgestimmt ist.
145. Verfahren zur Sortierung von Zellen gemäß Anspruch 144, worin der Schritt des Herstellens einer Zellquelle den Schritt der zur Verfügungstellung von ursprünglichen Nährstoffen für die Zellen umfaßt und weiter den Schritt der Bereitstellung von Sammelflüssigkeitsnährstoffen für die Zellen umfaßt und

worin der Schritt der Sammlung der Zellen mit der gewünschten Charakteristik den Schritt des Ausgleichs der ursprünglichen Nährstoffe und der Sammelflüssigkeitsnährstoffe nach der Beendigung des Schrittes der Sammlung der Zellen umfaßt.

146. Verfahren zur Sortierung von Zellen gemäß Anspruch 145, worin der Schritt des Sammelns von Zellen mit einer gewünschten Charakteristik in einer Sammelflüssigkeit den Schritt des Herstellens einer Zitrat-Sammelflüssigkeit umfaßt, die etwas 6% Eigelb vor dem Beginn des Sammelschrittes enthält.
147. Verfahren zur Sortierung von Zellen gemäß Anspruch 146, worin der Schritt des Herstellens einer Zellquelle den Schritt des Herstellens einer Zelle einer Quelle von Rinderspermazellen umfaßt.
148. Verfahren zur Sortierung von Zellen gemäß Anspruch 144, weiter umfassend den Schritt der Befruchtung eines Säugetiers unter Verwendung einer niedrigen Dosierung der Spermazellen.
149. Verfahren zur Sortierung von Zellen umfassend die Schritte:
  - a) Herstellen einer Zellquelle, welche die zu sortierenden Zellen liefert;
  - b) Herstellen einer Hüllflüssigkeit, um eine Hüllflüssigkeitsumgebung für die Zellen herzustellen;
  - c) Bestimmung einer Eigenschaft der Zellen
  - d) Unterscheidung zwischen Zellen mit der gewünschten Geschlechtscharakteristik
  - e) Sammeln der Zellen mit der gewünschten Geschlechtscharakteristik umfassend den Schritt der Abfederung der Zellen vor dem Anprall mit einem Sammelbehälter
150. Verfahren zur Sortierung von Zellen gemäß Anspruch 149, worin der Schritt der Abfederung der Zellen vor dem Anprall mit einem Sammelbehälter den Schritt des Bereitstellens einer weiten Öffnung des Behälters umfaßt.

70  
- 31 00.05.00

DE 198 82 943 T1

151. Verfahren zur Sortierung von Zellen gemäß Anspruch 150, worin der Schritt des Herstellens einer Zellquelle den Schritt des Herstellens einer Zellquelle von mechanisch empfindlichen Zellen umfaßt.
152. Verfahren zur Sortierung von Zellen gemäß Anspruch 150, worin der Schritt des Herstellens einer Zellquelle den Schritt des Herstellens einer Zellquelle von Spermazellen umfaßt.
153. Verfahren zur Sortierung von Zellen gemäß Anspruch 151, weiter umfassend den Schritt der Sortierung der Zellen in hoher Geschwindigkeit.
154. Verfahren zur Sortierung von Zellen gemäß Anspruch 153, worin der Schritt der Sortierung der Zellen bei hoher Geschwindigkeit im Schritt des Aussetzens dieser Zellen einem Druck von zumindest 50 Pounds/square inch umfaßt.
155. Verfahren zur Herstellung einer geschlechtsspezifischen Spermaprobe, umfassend den Schritt der Herstellung der Probe unter Verwendung eines Prozesses gemäß einer der Ansprüche 131, 134, 137, 140, 149, 144, oder 147.
156. Verfahren zur Herstellung von geschlechtsspezifischen Spermaproben gemäß Anspruch 155, weiter umfassend den Schritt der Sortierung der Zellen bei hoher Geschwindigkeit.
157. Verfahren zur Herstellung von geschlechtsspezifischen Spermaproben gemäß Anspruch 155, weiter umfassend den Schritt der Bereitstellung der geschlechtsspezifischen Spermaproben zur Befruchtung eines Säugetiers unter Verwendung einer niedrigen Dosierung der Spermazellen.
158. Verfahren zur Herstellung von geschlechtsspezifischen Spermaproben gemäß Anspruch 156, weiter umfassend den Schritt der Bereitstellung der geschlechtsspezifischen Spermaprobe zur Befruchtung eines Säugetiers unter Verwendung einer niedrigen Dosierung der Spermazellen.
159. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit gewünschtem Geschlecht umfassend den Schritt der Herstellung des Säugetiers unter Verwendung eines Prozesses gemäß einem der Ansprüche 131, 134, 137, 140, 149, 144 oder 147.

71  
22.05.00

DE 198 82 943 T1

160. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers gemäß Anspruch 159, weiter umfassend den Schritt der Sortierung der Zellen in hoher Geschwindigkeit.
161. Verfahren zur Herstellung einer geschlechtsspezifischen Spermaprobe gemäß Anspruch 159, weiter umfassend den Schritt der Befruchtung eines Säugetiers unter Verwendung einer niedrigen Dosierung der Spermazellen.
162. Verfahren zur Herstellung von geschlechtsspezifischen Spermaproben gemäß Anspruch 160, weiter umfassend den Schritt der Befruchtung eines Säugetiers unter Verwendung einer niedrigen Dosierung der Spermazellen.
163. Verfahren zur Herstellung von geschlechtsspezifischen Mehrfach-Embryos von einem weiblichen Säugetier, umfassend:
  - a) Hervorrufen von Superovulation in einem Säugetier, um zumindest zwei Eizellen zu schaffen, umfassend den Schritt des Gebrauchs eines Ovulationspharmazeutikums, um die Produktion von Mehrfach-Eizellen zu bewirken.
  - b) Bestimmung des Geschlechts einer Spermazelle eines männlichen Säugetiers;
  - c) Sortierung entsprechend des Geschlechts der Spermazellen;
  - d) Einführung von zumindest eines Teils der sortieren Spermazellen in einen Uterus des weiblichen Säugetiers nach dem Beginn des Östrus und
  - e) Befruchtung einer Vielzahl der Eizellen in den Uterus, um mehrfach geschlechtsspezifische Embryos herzustellen.
164. Verfahren zur Herstellung von geschlechtsspezifischen Mehrfach-Embryos gemäß Anspruch 163, worin die Schaffung der Superovulation während des Östruszyklusses gefördert wird.
165. Verfahren zur Herstellung von geschlechtsspezifischen Mehrfach-Embryos entsprechend Anspruch 164, worin der Schritt des Gebrauchs

eines Ovulationspharmazeutikums den Schritt der Einführung des Ovulationspharmazeutikums in Halbtagesabständen zwischen einem der Tage 2 und 18 des Östrus-Zyklusses umfaßt.

166. Verfahren zur Herstellung von geschlechtsspezifischen Mehrfach-Embryos gemäß Anspruch 165, worin der Schritt der Einführung des Ovulationspharmazeutikums in Halbtagesabständen das Injizieren von zumindest 7 Injektion umfaßt und weiter den Schritt der Einbringung eines Östrus-Manipulationssystems zumindest bei etwas der 6. oder 7. Injektion umfaßt.
167. Verfahren zur Herstellung von geschlechtsspezifischen Mehrfach-Embryos gemäß Anspruch 166, worin das Einführen von zumindest einem Teil der sortierten Spermazellen in den Uterus das Einführen dieser Spermazellen in beide Uterushorne des Uterusses umfaßt.
168. Verfahren zur Herstellung von geschlechtsspezifischen Mehrfach-Embryos gemäß Anspruch 167, worin das Einführen in beide Uterushörner das Einführen der Spermazelle etwas zwischen 20 und 24 Stunden nach dem Beginn des Östrusses umfaßt.
169. Verfahren zur Herstellung von geschlechtsspezifischen Mehrfach-Embryos gemäß Anspruch 163, worin der Schritt des Gebrauchs eines Ovulationspharmazeutikums zur Bewirkung der Produktion von Mehrfach-Eizellen den Schritt der Injektion einer Dosierung eines follikelstimulierenden Hormons mehrere Male am Tag umfaßt.
170. Verfahren zur Herstellung von geschlechtsspezifischen Mehrfach-Embryos gemäß Anspruch 169, worin der Schritt der Herstellung von Superovulation im Säugetier, um zumindest zwei Eizellen zu schaffen, weiter den Schritt der Inkorporierung eines Östrusmanipulationssystems umfassend den Schritt der Supplementierung der Dosierung des follikelstimulierenden Hormons mit Prostaglandin F2 alpha umfaßt.
171. Verfahren zur Herstellung von geschlechtsspezifischen Mehrfach-Embryos gemäß Anspruch 170, worin die Injizierung der Dosierung eines follikelstimulierenden Hormons mehrere Male am Tage die Injektion des follikelstimulierenden Hormons in etwas Halbtagesabständen mit einem Dosierungslevel von 6, 6, 4, 4, 2, 2, 2 und 2 mg zwischen den Tagen 9 und 12 innerhalb des Östruszyklusses umfaßt und worin die Dosierung

73  
-24  
30.05.00

DE 198 82 943 T1

des follikelstimulierenden Hormons mit Prostaglandin F2 alpha Supplementierung den Schritt der Injektion von 25 bzw. 12,5 mg von Prostaglandin F2 alpha zusammen mit der sechsten bzw. siebten Dosierung des follikelstimulierenden Hormons umfaßt.

172. Verfahren zur Herstellung von geschlechtsspezifischen Mehrfach-Embryos gemäß Anspruch 163, weiter umfassend die Schritte:
  - a) Anfärben von Spermazellen eines männlichen Säugetiers;
  - b) Sortieren entsprechend des Geschlechts der Spermazellen unter Gebrauch der Hochgeschwindigkeitsflußzytometrie; und
  - c) Konzentration der aussortierten Spermazellen.
173. Verfahren zur Herstellung von geschlechtsspezifischen Mehrfachembryos gemäß Anspruch 163, worin die Einführung von zumindest einem Teil der sortierten Spermazellen den Gebrauch einer niedrigen Dosierung der Spermazellen umfaßt.
174. Verfahren zur Herstellung eines geschlechtsspezifischen Mehrfachembryos gemäß Anspruch 172, worin die Einführung von zumindest eines Teils der sortierten Spermazellen den Gebrauch einer niedrigen Dosis der Spermazellen umfaßt.
175. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit gewünschtem Geschlecht, umfassend den Schritt der Herstellung des Säugetiers unter Verwendung des Prozesses wie in Anspruch 163 beschrieben.
176. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit gewünschtem Geschlecht, umfassend die Herstellung eines geschlechtsbestimmten Spermazellen-Säugetiers unter Verwendung der Prozesse von Anspruch 175 und weiter umfassend die Sortierung dieser Zellen bei hoher Geschwindigkeit.
177. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit gewünschtem Geschlecht gemäß Anspruch 175, weiter umfassend die Befruchtung des weiblichen Säugetiers unter Verwendung einer niedrigen Dosierung der Spermazellen.

74  
-25  
00.05.00

DE 198 82 943 T1

178. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit gewünschtem Geschlecht gemäß Anspruch 175, weiter umfassend die chemische Abstimmung einer Hüllflüssigkeit, um eine Hüllflüssigkeitsumgebung für die Zellen zu schaffen, die mit sowohl einer Vorsortierungs- als auch einer Nachsortierungs-Zellflüssigkeitsumgebung abgestimmt ist, umfassend das Herstellung einer Hüllflüssigkeit, welche etwas 2,9 % Natriumzitat enthält.
- 179 Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit gewünschtem Geschlecht gemäß Anspruch 178, worin das chemische Abstimmen einer Hüllflüssigkeit um eine Hüllflüssigkeitsumgebung für die Zellen zu schaffen, welche mit sowohl einer Vorsortierungs- als auch einer Nachsortierungs-Zellflüssigkeitsumgebung abgestimmt ist, umfassend der Herstellung einer Hüllflüssigkeit, welche ein HEPES-gepuffertes Medium enthält.
180. Verfahren zur Herstellung eines Säugetiers mit gewünschtem Geschlecht gemäß Anspruch 179, weiter umfassend das Sammeln von Spermazellen dieses Geschlechts und Abfederung der Zellen vor dem Anprall mit einem Sammelbehälter.
181. Verfahren zur Sortierung von Zellen, umfassend
- a) Herstellung einer Zellquelle, welches die zu sortierenden Zellen
  - b) das chemische Koordinieren einer Hüllflüssigkeit, um eine Hüllflüssigkeitsumgebung für die Zellen zu schaffen, welche mit sowohl einer Vorsortierungs- als auch einer Nachsortierungs-Zellflüssigkeitsumgebung abgestimmt ist;
  - c) Bestimmung einer Eigenschaft der Zellen;
  - d) Unterscheidung zwischen Zellen mit der gewünschten Geschlechtscharakteristik; und
  - e) Sammeln der Zellen mit der gewünschten Geschlechtscharakteristik.
182. Verfahren zur Sortierung von Zellen wie in Anspruch 181 beschrieben, weiter umfassend das Sortieren der Zellen mit hoher Geschwindigkeit.

1/4

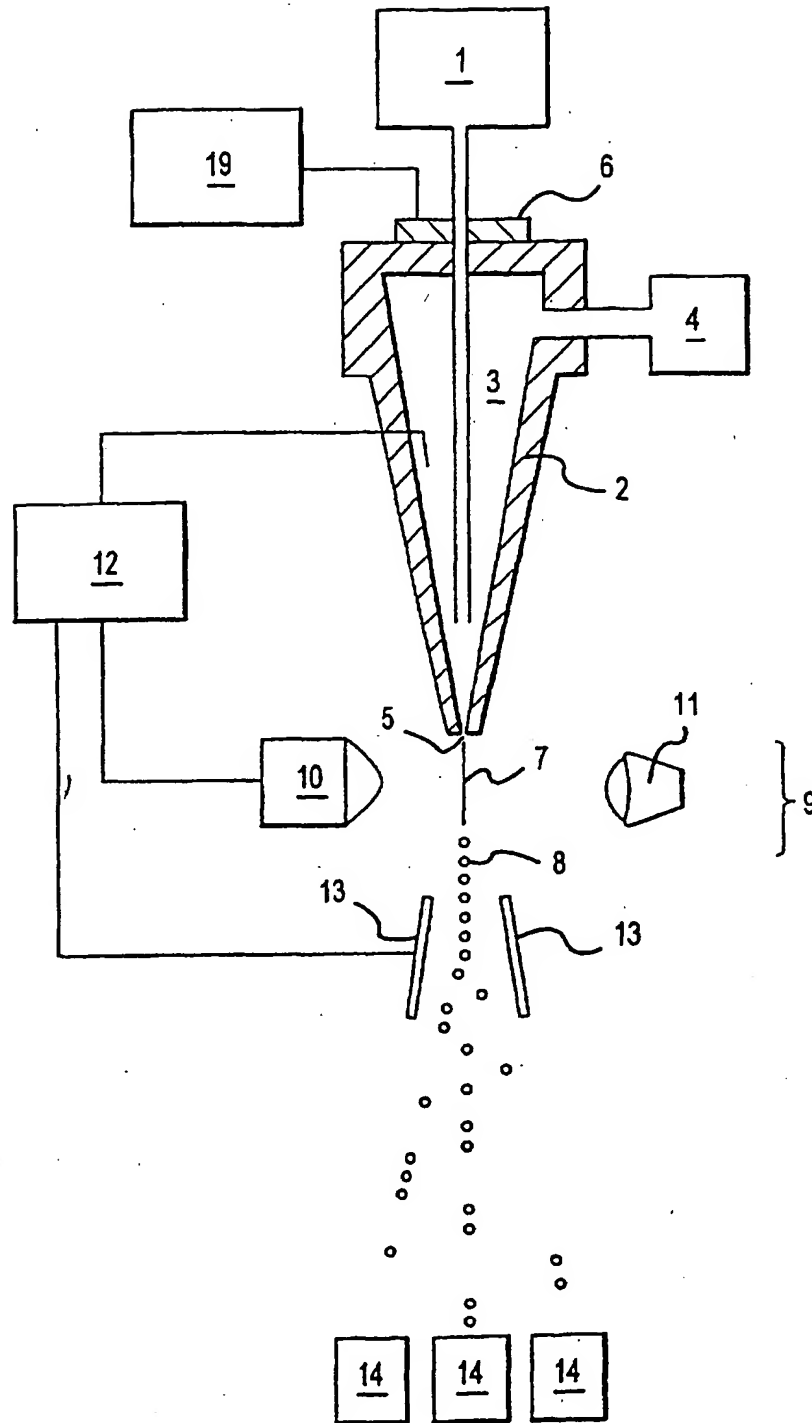


FIG 1



75

30.08.00

76

DE 198 82 943 T1

2/4

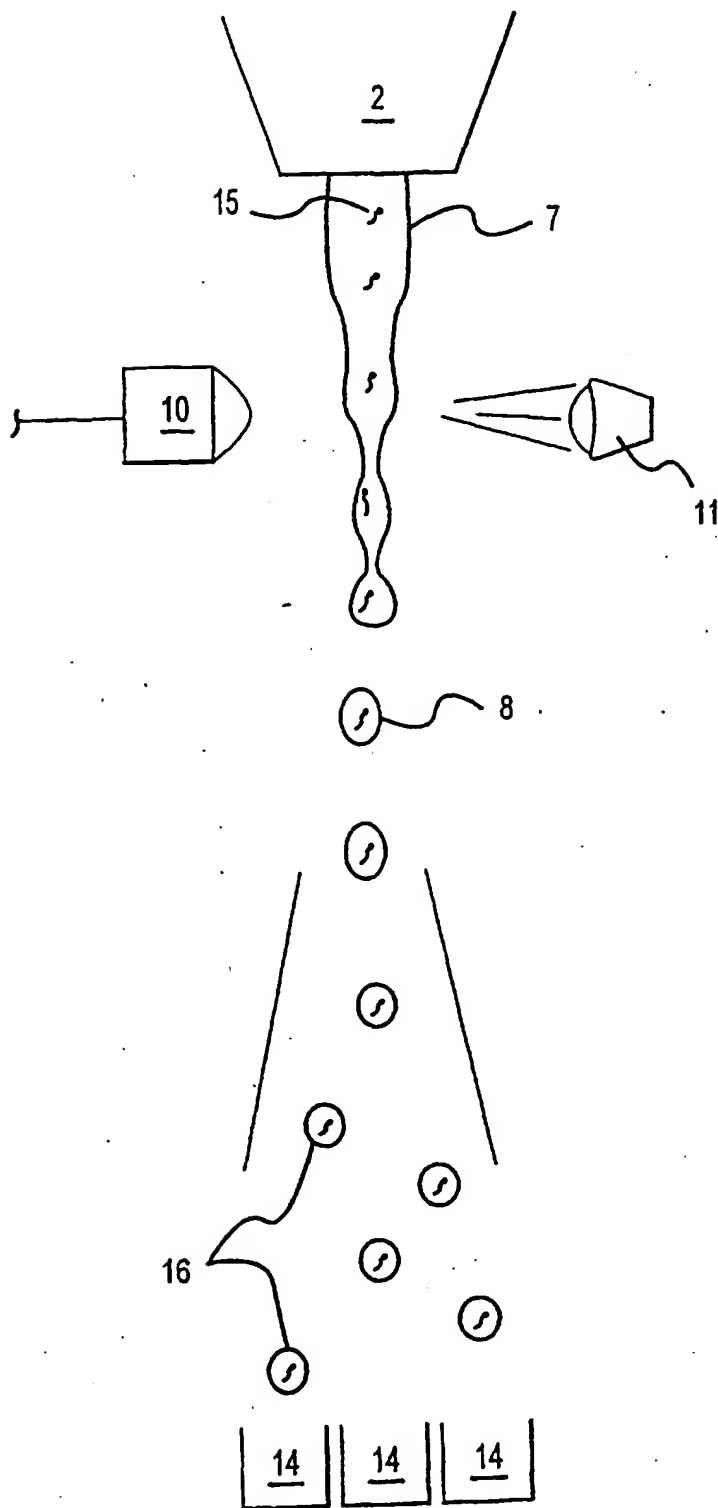
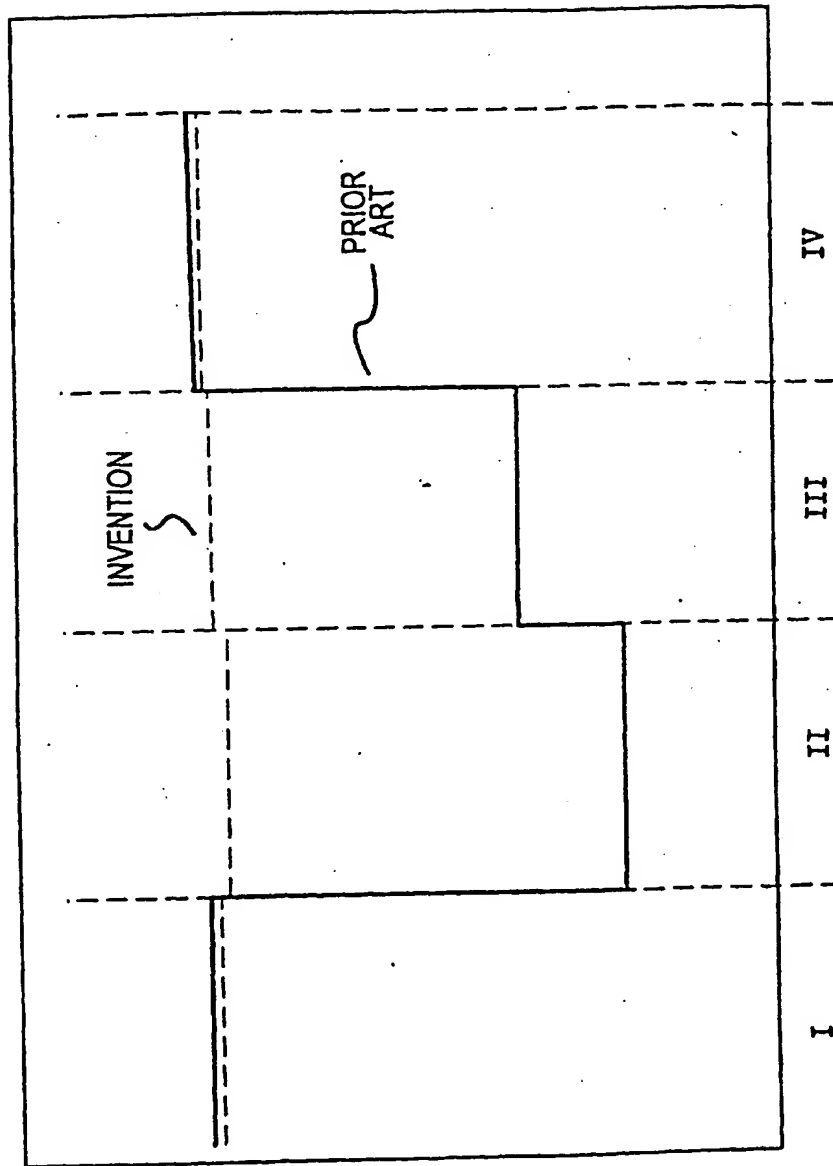


FIG 2

77

DE 198 82 943 T1

**3/4**



### CHEMICAL FACTOR

## PHASE TIME

FIG. 3

28  
30.06.00

78

DE 198 82 943 T1

4/4

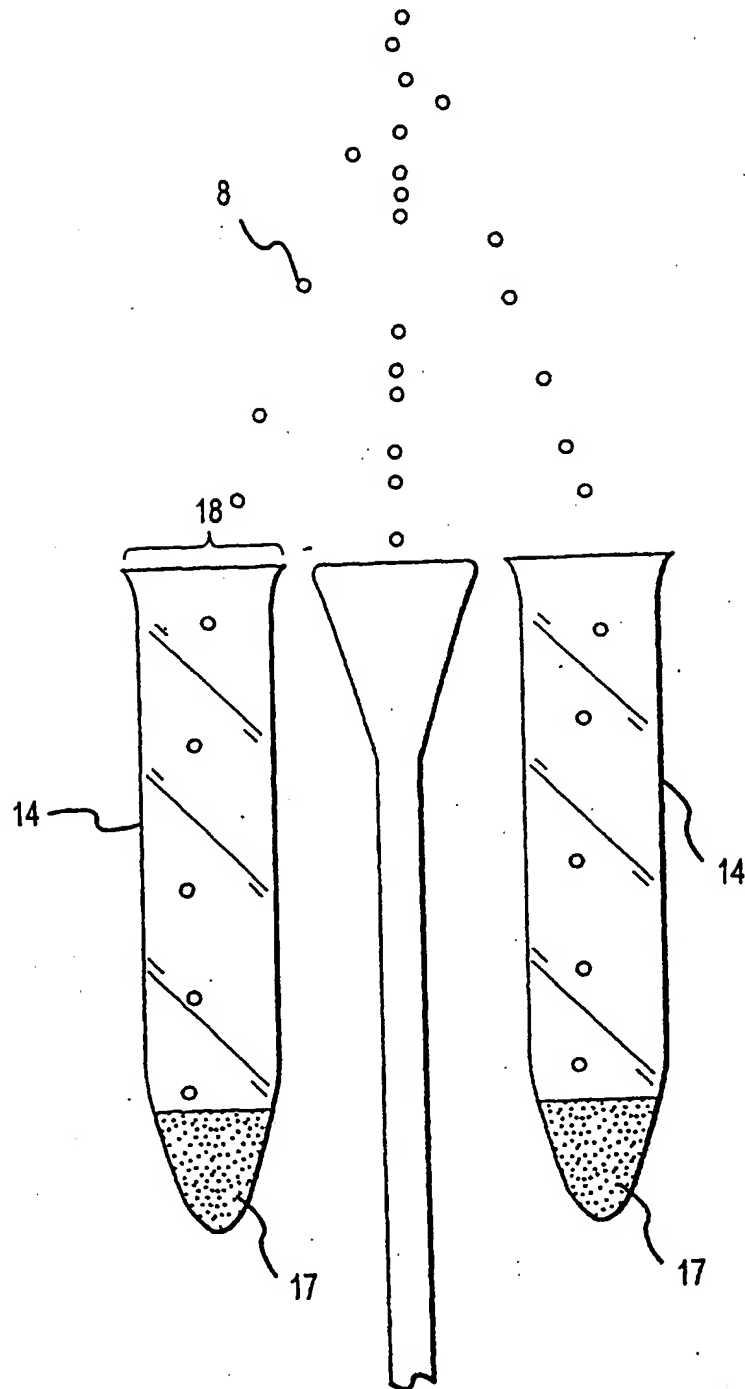


FIG 4

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**